

Karl Armin Polster

ZUR PRÄPARATIVEN GEWINNUNG
VON ROTWEINGERBSTOFFEN

1966
—

Frankfurt am Main 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546413_0033

Druck: Bildstelle der J.W. Goethe-Universität
Frankfurt a.M.

Zur präparativen Gewinnung von
Rotweingerbstoffen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Karl Armin P o l s t e r
aus Chemnitz
Oktober 1966

Gedruckt mit Genehmigung
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Frankfurt am Main



Dekan: Prof. Dr. J. S t a u f f

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. D i e m a i r

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. S c h n e i d e r

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1966

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Professor Dr. ing. et phil. W. D i e m a i r im Institut für Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. W. D i e m a i r , möchte ich an dieser Stelle für die wissenschaftliche Anleitung und die großzügige Förderung meiner Arbeit sehr herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

<u>A. Einleitung.</u>	Seite
Der Gegenstand	6
Chemie der Gerbstoffe	6
I. Hydrolysierbare Gerbstoffe	6
a) Gallotannine	6
b) Ellagengerbstoffe	6
II. Kondensierte Gerbstoffe	7
a) Catechine	7
b) Leucoanthocyanidine	10
Der Begriff "Gerbstoff"	12
Das Problem	13
Die Aufgabe	15
 <u>B. Experimenteller Teil.</u>	
<u>Untersuchung der Maische</u>	16
I. Der Most	16
a) Analyse	16
b) Extraktionsversuche	16
1.) Perforation	18
2.) Ausschüttelung	20
3.) Vergleich der Extrakte	20
c) Spektren von Catechinlösungen	20
d) Versuche zur Farbstoffentfernung	22
II. Die Trester	24
a) Extraktion und Entfetten	24
b) Vorversuche am Extrakt	24
1.) Stickstoffbestimmung	24
2.) UV-Absorptionsspektrum	25
3.) Vanillin-Salzsäure-Reaktion	25
4.) Adsorption an Polyamid	26
c) Fraktionierung an einer Polyamidsäule	28
d) Adsorption durch Schütteln mit Polyamidpulver	29
e) Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie	31
1.) Polyamid	31
2.) Kieselgel	33
III. Zusammenfassung der Ergebnisse	36

<u>Untersuchung des Weines</u>	Seite
I. Analyse	36
II. Isolierung des Gerbstoffgemischs	37
a) Ausschüttelung	37
Chromatographiervorschrift	38
b) Adsorption - Desorption	40
1.) Gewinnung des Gesamtadsorbats durch Desorption	40
Chromatographie	42
2.) Untersuchung des nicht desorbierbaren Adsorbats	46
3.) Aufgliederung des Adsorbats durch schrittweise	
Desorption	49
Grundversuch	49
Probeversuche zum endgültigen Aufarbeitungsgang	52
Versuche im präparativen Maßstab	54
c) Eigenschaften des Gerbstoffgemischs	58
1.) Löslichkeit	58
2.) Chemische Reaktionen	59
3.) Adsorptionsreaktionen	59
4.) Reaktion mit Gelatinelösung	59
5.) Vergleich mit Catechin	60
6.) Zusammenfassung der Ergebnisse	61
7.) Chromatographisches Verhalten	61
III. Isolierung der Gerbstoff-Hauptfraktion	66
a) Elution der Startzone	66
b) Chromatographie an einer Sephadex-Säule	68
1.) Entwicklung der Trennmethode	69
2.) Trennergebnisse bei Sauerstoffausschluß	71
3.) Trennergebnisse beim Wechsel des Trägers	75
c) Eigenschaften der Gerbstoff-Hauptfraktion	80
IV. Diskussion eines anderen Weges der Gerbstoffgewinnung	81
 <u>C. Zusammenfassung.</u>	 84
 <u>D. Literaturverzeichnis.</u>	 86

A. Einleitung.

Nahezu jede Arbeit, die die Analytik der Gerbstoffe in Lebensmitteln zum Gegenstand hat, beginnt mit dem Versuch einer Definition des Begriffes "Gerbstoff". Jeder Autor sieht sich gezwungen, aus der Fülle der polyphenolartigen Stoffe, die in Lebensmitteln auftreten können, gewisse Stoffe auszuklammern, weil sie aus diesen oder jenen Gründen nicht der Definition entsprechen, die er anzuwenden sich entschlossen hat. Der Grund für eine solche Unsicherheit ist zunächst von der chemischen Seite her in der Vielfalt der Substanzen zu sehen, die am Aufbau der natürlichen Gerbstoffe beteiligt sein können, sowie in der bisher noch weitgehend fehlenden Aufklärung der Struktur ihrer Kondensate. Hinzu kommt, daß der chemische Aufbau nicht zwingend auf technologische Eigenschaften schließen läßt. Haben noch 1957 H e n n i g und B u r k h a r d t (1) monomere Gerbstoffvorstufen wie Catechin in den Begriff "Gerbstoff" einbezogen, so scheint sich neuerdings die Ansicht durchzusetzen, daß nur ihre Kondensate als Gerbstoffe angesprochen werden dürften. In diesem Sinne fassen auch R i b é r e a u - G a y o n und S t o n e s t r e e t (2) den Begriff enger. Betrachtet man den gegenwärtigen Stand der Kenntnisse auf dem Gebiet der natürlichen Gerbstoffe an Hand der Übersichtsarbeit von S c h m i d t und M a y e r (3), so gelangt man zu folgender Einteilung:

I. Hydrolysierbare Gerbstoffe.

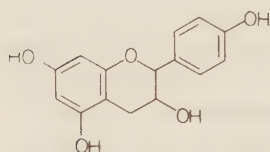
Sie bestehen im wesentlichen aus

- a) Gallussäure und Hexose (Gallotannine),
- b) Gallussäure, Ellagsäure und Hexose (Ellagergerbstoffe).

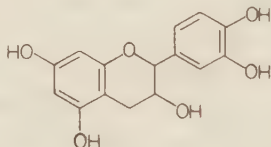
Sie kommen in verhältnismäßig wenigen Pflanzen vor (Gallen, Sumach, Hamamelis, Granatäpfel, gewissen Eichen und Akazien) und lassen sich durch Säurehydrolyse oder fermentative Spaltung in ihre Bestandteile zerlegen. H e n n i g und B u r k h a r d t (1) haben im Wein Gallussäure und Ellagsäure nachgewiesen, doch wird die Gegenwart hydrolysierbarer Gerbstoffe in der Weintraube von anderen Autoren angezweifelt (2) (4). R i b é r e a u - G a y o n und S t o n e s t r e e t (2) deuten das Auftreten der Spaltstücke im Wein als Ergebnis der Extraktion aus den zur

wart von Mineralsäuren in mehr oder weniger stark gefärbte Kondensate. Im Zuge der Vergrößerung des Molekulargewichtes gelangt man schließlich zu den rotbraunen Phlobaphenen, die in Wasser nicht mehr löslich sind und keine gerbenden Eigenschaften mehr entfalten. Nach eingehendem Studium dieses Verhaltens sind **F r e u d e n b e r g** und **W e i n g e s** (5) (7) zu der Annahme gekommen, daß die Vorgänge in der Pflanze denjenigen in vitro entsprechen dürften: Der dehydrierenden Verknüpfung der Elementarmolekeln durch Dehydrasen folgt - vor allem postmortal - eine Polykondensation unter dem Einfluß von Feuchtigkeit und Säure. Die Zerlegung der Kondensate ist mit einfachen hydrolytisch wirkenden Mitteln nicht möglich. Daher haben sich bis heute die Catechingerbstoffe der Strukturaufklärung entzogen.

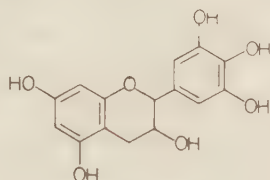
Die wichtigsten monomeren Grundtypen, die im Pflanzenreich aufgefunden wurden, sind folgende (1) (3) (8):



Afzelechin

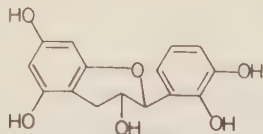


Catechin

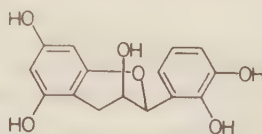


Gallocatechin

Diese Verbindungen bilden zwei epimere Reihen von optischen Antipoden; ihre Konfiguration sei am Beispiel des Catechins gezeigt (3):

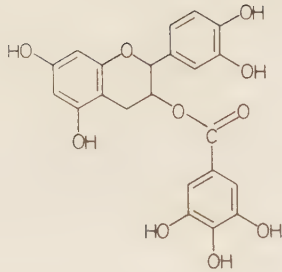


Catechin

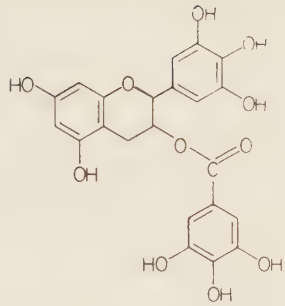


Epicatechin

In der Natur überwiegen d-Catechin, l-Epicatechin, d-Gallocatechin, Afzelechin wurde als l-Epiverbindung gefunden. Von den Epiverbindungen des Catechins und des Gallocatechins sind Gallussäureester ("Gallate") bekannt:

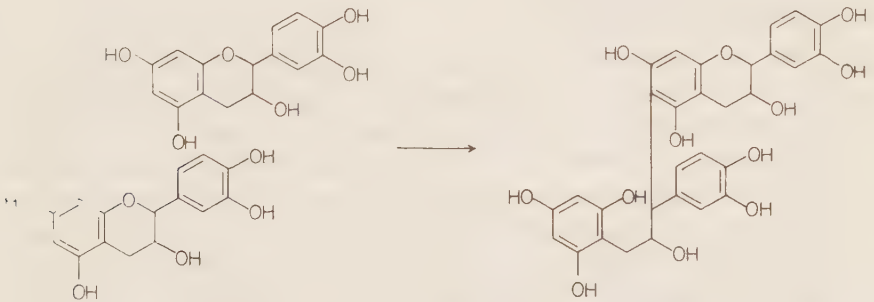


Catechingallat



Gallocatechingallat

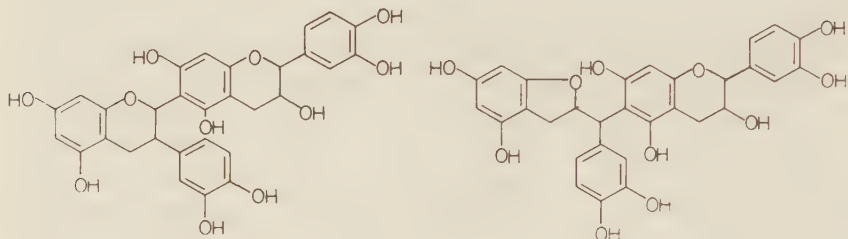
Die Diskussion über die Art der Entstehung der Gerbstoffe aus diesen Monomeren ist noch im Gange; selbst die Struktur des Dimeren scheint noch nicht gesichert. Es wird angenommen, daß sich zwischen dem C6 der einen und dem C2 der anderen Molekel eine Bindung ausbildet, wie es beispielsweise die von F r e u - d e n b e r g und W e i n g e s (5) (7) aufgestellte Formel ausdrückt:



Die bei dieser Formulierung angenommene Vermehrung der phenolischen Hydroxylgruppen konnte auf analytischem Wege belegt werden.

M a y e r und M e r g e r geben in ihrer eingehenden Studie über die Selbstkondensation des Catechins (6) eine Darstellungs-

vorschrift für ein Kondensationsdimeres des Catechins und diskutieren zwei andere Formulierungen seiner Struktur:



Sie bezweifeln die von F r e u d e n b e r g und W e i n - g e s (5) gefundene Vermehrung der phenolischen Hydroxylgruppen; ihre Auffassung drückt sich in den angegebenen Formeln aus.

Daß die Vanillin-Salzsäure-Reaktion, die auf m-ständige OH-Gruppen anspricht, mit fortschreitender Kondensation der Gerbstoffe immer schwächer wird (8) (9), entspricht eigenen Beobachtungen und läßt sich gut durch sterische Hinderung erklären. So bleibt nach allen drei Kondensationshypothesen für jede Gerbstoffmolekel stets nur eine m-Gruppierung reaktionsfähig.

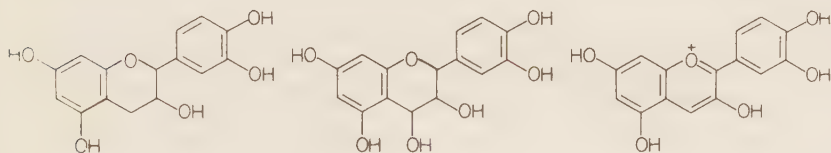
b) Leucoanthocyanidine.

Als 1920 R o s e n h e i m zum ersten Mal ein Leucoanthocyanidin isoliert hatte, war man der Ansicht, damit die Vorstufe der Pflanzenfarbstoffe in Händen zu haben, da dieser Verbindungstyp beim Erhitzen mit Säure in das entsprechende Anthocyanidin (das Aglykon des Anthocyans) übergeht. Seitdem jedoch B a t e - S m i t h und S w a i n (10) und B a t e - S m i t h (11) sich eingehend mit dem Vorkommen dieser "Anthocyanidinbildner" beschäftigt haben, weiß man, daß diese Eigenschaft der Leucoanthocyanidine bei weitem weniger bedeutend ist als diejenige, analog den Catechinen zu Gerbstoffen zu kondensieren.

Isolierungen dieser Gerbstoffe aus Hölzern und ihr Verhalten bei der Papierchromatographie beschreiben R o u x und E v e - l y n (12) (13). Die Formeln einiger natürlich vorkommender und synthetischer Monomeren finden sich in der bereits zitierten

Arbeit von F r e u d e n b e r g und W e i n g e s (7). Die Klasse der Leucoanthocyanidin-Gerbstoffe bildet die Hauptmenge der in Obstarten vorkommenden Gerbstoffe. H e r r m a n n widmet diesen Verbindungen eine Übersichtsarbeit (14), und R i b é - r e a u - G a y o n (2) diskutiert die Verhältnisse im Rotwein.

Leucoanthocyanidine stehen hinsichtlich ihrer Oxydationsstufe zwischen den Catechinen und den Anthocyanidinen; sie treten in der Natur als Hydrate auf und sind damit Flavan-3,4-diole:



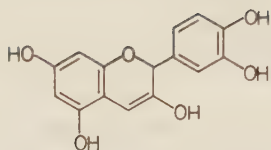
Catechin

Leucocyanidinhydrat

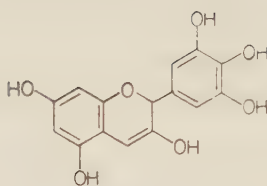
Cyanidinkation

Die Kohlenstoffatome 5, 6, 7 und 8 können unterschiedlich hydroxyliert sein; damit ist die Zahl der möglichen Monomeren größer als bei den Catechinen. Im Gegensatz zu den Farbstoffen enthalten sie nach dem heutigen Stand der Kenntnisse keinen glykosidisch gebundenen Zucker. Ob Ester mit Gallussäure wie bei den Catechinen existieren, ist bislang noch unbekannt.

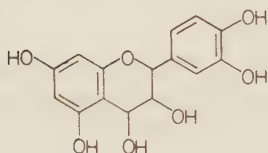
Die Leucoanthocyanidine kondensieren noch rascher als die Catechine; dies erschwert einerseits ihre Darstellung, andererseits ihren Nachweis, da die hierzu benutzte Farbstoffbildung mit Säure stets von einer Phlobaphenbildung begleitet wird. Indessen gibt es bereits mehrere Methoden, diese Fehlerquelle auszuschalten; es sei hier nur die nach P i g m a n erwähnt (15), bei der mit HCl-Isopropanol unter Druck gearbeitet wird. Dabei soll die Phlobaphenbildung vermindert werden. Es schließt sich der papierchromatographische Nachweis der gebildeten Anthocyanidine an. Im Rotwein wurden Leucocyanidin und Leucodelphinidin gefunden:



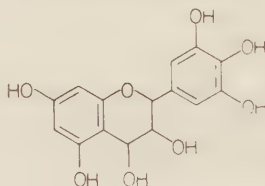
Leucocyanidin



Leucodelphinidin



Leucocyanidinhydrat



Leucodelphinidinhydrat

Die gegebene Übersicht über die Chemie der natürlichen Gerbstoffe ist nicht vollständig; sie diente lediglich dem Zweck, die Eigenart des zu behandelnden Stoffes an Beispielen darzulegen und in grossen Zügen anzugeben, was bekannt, was noch unbekannt und was strittig ist. Auf diese Weise sollte die Grundlage zum Verständnis der Problematik der Aufgabenstellung dieser Arbeit gegeben werden. Nähere Einzelheiten über die Monomeren, über Konfigurations- und Konformationshypothesen, über die Kondensation und über die Biosynthese dieser Verbindungen vermittelt ein inzwischen erschienenes Buch von H a s l a m (15a).

Wo in den vorstehenden Ausführungen über die Gerbstoffbausteine der Begriff "Gerbstoff" verwendet wurde, geschah das bereits in einer Weise, die seine Grenzen ziemlich eng setzt und damit den moderneren Vorstellungen entspricht. Kritische Auseinandersetzungen über die Festlegung dieses Begriffs finden sich in der neueren Literatur besonders bei H e r r m a n n (4) und - spezifiziert auf den Rotwein - bei R i b é r e a u - G a y o n (2). Beide Autoren benutzen als Definitionsgrundlage die technologische Eigenschaft der Gerbstoffe, Hauteiweiß in nicht fäulnisfähiges Leder zu verwandeln oder aus Eiweißlösungen Niederschlä-

ge auszufällen. Erstere ist der Grundvorgang in der Gerberei von Tierhäuten, letztere kann sich organoleptisch auswirken, indem unter dem Einfluß gerbstoffhaltiger Lebensmittel der Speichel vorübergehend seine Gleitwirkung verliert; man empfindet dies als "adstringierend". Beide Erscheinungen beruhen auf der Bildung unlöslicher Verbindungen, die durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen des Gerbstoffs und den Peptidgruppen des Eiweißes zustande kommen. So reagieren nur - abgesehen von den hydrolysierbaren Gerbstoffen - die Kondensationspolymeren der Catechine und der Leucoanthocyanidine, und zwar vom Dimeren bis etwa zum Dekameren, das heißt etwa vom Molekulargewicht 600 bis 3000. Kondensate höheren Molekulargewichts sind als Phlobaphene anzusprechen; sie gerben nicht.

Bestimmungsmethoden für phenolische Verbindungen in Pflanzen oder Pflanzenextrakten sind ebenso zahlreich wie die Klagen über ihre Unzulänglichkeit. Pauschale Bestimmungsmethoden, wie Farb- und Fällungsreaktionen mit Metallen oder der Nachweis ihrer Oxydierbarkeit oder Adsorbierbarkeit erfassen auch andere Stoffe mit, sind also nicht spezifisch genug, wenn sie etwas über den Gerbstoffgehalt aussagen sollen. Andererseits liefern auch verhältnismäßig spezifische Reaktionen, wie die Vanillin-Salzsäure-Methode, keine korrekten Werte, sondern nur Kennzahlen, da die definierte Bezugssubstanz "Gerbstoff" fehlt. Die Auswertung eines Absorptionsmaximums im ultravioletten Spektralbereich schließlich erfordert darüberhinaus meist eine umständliche Vorreinigung der Extrakte durch Ausschütteln, und die unterschiedliche Löslichkeit der einzelnen polyphenolischen Verbindungen legt die Vermutung nahe, daß hier nur Fraktionen erfaßt werden.

Es ist verständlich, daß die Unklarheit über den chemischen Aufbau der höhermolekularen Gerbstoffe, zusammen mit der Unsicherheit über die Grenzen des Begriffs "Gerbstoff" eine große Anzahl von Nachweis- und Bestimmungsmethoden hervorgebracht hat, deren Prinzip sich, wie oben kurz veranschaulicht wurde, aus der jeweiligen Betrachtungsweise ergibt. Trotzdem über-

rascht es, daß bereits 1913 D e k k e r in seiner Monographie über die Gerbstoffe (16) nicht weniger als 86 verschiedene Methoden zitieren kann. Ihre Zahl vermehrt sich noch heute ständig.

Dabei sind die nach den verschiedenen Methoden erhaltenen Resultate untereinander nicht vergleichbar, wie B u r k h a r d t (9) an einer Reihe von Analysen zeigen konnte. Der Grund liegt, neben der Tatsache, daß nicht mit jeder Methode die gleichen Substanzen erfaßt werden, hauptsächlich im Fehlen der authentischen Bezugssubstanz: Einmal wird "als Gerbsäure" berechnet, ein anderes Mal als "Cyanidin", ein drittes Mal "als Catechin"; hier wird ein Methanolextrakt aus Tee (17), dort ein wäßriger Extrakt aus Rebenblättern und -stengeln (18) zum Vergleich benutzt, und jeder Autor muß zugeben, daß seine Methode nur Näherungswerte oder Kennzahlen liefert.

Nun sind gerade die beiden zuletzt genannten Möglichkeiten der Wahl einer Bezugssubstanz nicht die schlechtesten, weil da die Eichkurve tatsächlich mit einem Lebensmittelgerbstoff aufgestellt wird und nicht mit einer seiner Vorstufen oder gar mit der überwiegend aus hydrolysierbaren Gerbstoffen zusammengesetzten "Gerbsäure". Trotzdem bleiben auch diese Methoden ungenau, weil niemand über den Aufbau der Bezugssubstanz genau unterrichtet ist, mögen auch ihre Bausteine weitgehend bekannt sein. So wird die Isolierung der Bezugssubstanz - aus welchem Material auch immer - in jedem folgenden Fall zu einem vom vorigen vielleicht kaum, vielleicht beträchtlich abweichend zusammengesetzten Produkt führen, ohne daß es möglich wäre, die Abweichung exakt anzugeben.

Leicht läßt sich aus solchen Überlegungen der Schluß ziehen, daß es besser sei, die mehrwertigen Phenole direkt zu bestimmen, anstatt eine Gerbstoff-Kennzahl zu ermitteln. (4). Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß man mit definierten Bezugssubstanzen reproduzierbare Werte erhält und sich damit auf das Gebiet der exakten Analytik beschränkt. Der Nachteil ist, daß man damit auf das Erfassen gerade der höherkondensierten, wirklich gerbenden Substanzen verzichten muß, weil man sie nicht in reiner

Form zum Aufstellen einer Eichkurve zur Verfügung hat.

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun zu versuchen, das Gemisch der polyphenolartigen Substanzen, das gewöhnlich pauschal als "Gerbstoff" bezeichnet wird, aufzugliedern. Ein Teil der gerbstoffbildenden Monomeren ist bereits bekannt; so wiesen H e n n i g und B u r k h a r d t (1) (19) und R i b é r e a u - G a y - o n und S t o n e s t r e e t (2) im Wein neben anderen Polyphenolen die oben aufgeführten Gerbstoffvorstufen nach. Die Differenzierung der höher kondensierten, echten Gerbstoffe ist dagegen bisher noch nicht versucht worden, vielmehr wurden diese Substanzen - namentlich in der Kellereitechnologie und Weinanalytik - immer als Verunreinigungen störend empfunden. Gerade ihre nähere Kenntnis aber ist für die Analytik, wie oben ausgeführt wurde, sehr wünschenswert, und möglicherweise können die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Trennerfolge zum näheren Studium dieser in ihrem Aufbau noch unbekannten Stoffe anregen.

B. Experimenteller Teil.

Ausgangsmaterial für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen waren Maische und Wein der Charge 5/1964 des ABmannshäuser Höllenberg Spätburgunders, die freundlicher Weise in ausreichender Menge von der Staatsdomäne Eltville zur Verfügung gestellt wurden. Hierfür sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Untersuchung der Maische.

Erste Untersuchungen mit dem Ziel, Eigenschaften und Reaktionen des Rotweingerbstoffs soweit in die Hand zu bekommen, daß an eine präparative Darstellung aus dem fertigen Wein gegangen werden konnte, war die frisch von der Kufe entnommene Maische. Sie wurde mittels einer hydraulischen Presse in Most und Trester getrennt, der Most anschließend kolliert, zentrifugiert und filtriert und mit 150 mg/l Kaliumpyrosulfit eingeschwefelt. Die Trester wurden aufgelockert, bei 50° C getrocknet und in einer Schlagkreuzmühle bis zur grobkörnigen Beschaffenheit gemahlen.

I. Der Most.

a) Analyse.

Dichte, pyknometrisch:	1,0949
Gesamtextrakt, pyknometrisch:	247,5 g/l
Zucker:	218,7 g/l
Zuckerfreier Extrakt:	28,8 g/l
pH, potentiometrisch:	3,9
Gesamtsäure, potentiometrisch:	4,6 g/l, ber. als Weinsäure
Asche:	10,7 g/l

b) Extraktionsversuche.

Die Gerbstoffe, die hier untersucht werden sollen, also Kondensationspolymere vom Catechin- und Leucoanthocyanidintyp, sind

dank der Vielzahl von Hydroxylgruppen im Molekül in polaren Lösungsmitteln gut löslich. Deshalb werden auch zur Extraktion von Gerbstoff aus festen Materialien meist Wasser oder Alkohole verwendet (18) (20). Soll hingegen aus flüssigem Material extrahiert werden, so ist man gezwungen, ein mit Wasser nicht mischbares, aber trotzdem möglichst polares Lösungsmittel zu verwenden. Als solches bietet sich der Essigsäureaethylester an, und entsprechende Extraktionen sind auch bereits beschrieben (21) (17).

H a t h w a y und S e a k i n s (22), die Catechin unter dem Einfluß von Polyphenoloxidasen experimentell zu Gerbstoffen kondensierten, isolierten als Vergleichssubstanz aus dem Kernholz von *Acacia catechu* und *Uncaria gambir* einen Gerbstoff, indem sie den wäßrigen Auszug zunächst mit Aether, dann mit Essigester jeweils erschöpfend extrahierten. Sie entfernten so die Fe^{III} und Vanillin reagierenden Stoffe (Monomere und niedere Polymere) und behielten in der wäßrigen Phase ein Produkt mit gerbenden Eigenschaften zurück, wie der Hautpulvertest und die Gelatinefällung zeigten.

Andere Autoren fällten Polyphenole aus wäßrigen Lösungen mit Coffein, so P o r t e r und S c h w a r t z (20) den Gerbstoff aus Rebenblättern. Das Coffein wird anschließend mit Chloroform entfernt. H e n n i g und B u r k h a r d t schließlich konzentrierten in ihrer grundlegenden Arbeit "über die Farb- und Gerbstoffe, sowie Polyphenole und ihre Veränderungen im Wein" (1) den Wein durch Gefriertrocknung und analysierten den Rückstand durch Papierelektrophorese oder seine Aceton-, Essigester- und Aetherextrakte durch zweidimensionale Papierchromatographie.

Die Gefriertrocknung, die zweifellos das schonendste Verfahren zur Anreicherung solcher empfindlichen Substanzen darstellt, ist jedoch nur im kleinen Maßstab (50 ml), das heißt für analytische Zwecke gut durchzuführen. Außerdem erreicht man damit noch keine Fraktionierung der Weininhaltsstoffe. Aus diesen Gründen wurden die ersten Versuche zur Isolierung der Gerbstoffe

durch Extraktion des Mostes mit Essigester vorgenommen.

1.) Perforation.

Im Perforator wurden 500 ml Most mit 200 ml Essigester extrahiert. Erhitzt wurde mit einer Bunsenflamme über dem Drahtnetz, da die Wärme des Wasserbades nicht ausreichte (Essigester $K_p = 77^\circ \text{C}$), um den Ester bis zum Kühler in Dampfform hochzutreiben. Unter schwacher Emulsionsbildung und Ausflockung im Most fiel nach halbstündiger Extraktion ein hellgelbes Perforat an, das durch übergerissenen Most verunreinigt war. Ein zweiter Versuch wurde daraufhin mit nur 450 ml Most und zur Vermeidung von Ausflockungen unter Anlegen eines schwachen Unterdrucks (130 bis 140 Torr) wieder mit 200 ml Ester angesetzt. Aus dem siedenden Wasserbad wurde nach zweistündiger Extraktion ein dunkelgelbes Perforat erhalten. Das Perforat wurde im Vakuum bei 25°C vom Lösungsmittel befreit; es verblieb ein dunkelroter Rückstand, der sich leicht mit hellroter Farbe in wenig Methanol löste.

Die mit Methanol verdünnte Lösung zeigte im Absorptionsspektrum, aufgenommen mit dem automatisch registrierenden Spektrophotometer 137 UV (Perkin-Elmer) in 1 cm-Quarzküvetten, Maxima bei 228 und 286 nm, sowie eine Schulter um 265 nm. Bei der Aufnahme einer doppelt so starken Lösung war diese Schulter als schwaches weiteres Maximum bei 264 nm erkennbar. Im sichtbaren Spektralbereich fanden sich keine Absorptionsmaxima.

O w a d e s , R u b i n und B r e n n e r (21) säuerten die Gerbstofflösungen an, um die Gewähr zu haben, daß die undissoziierten Phenole vorliegen - sowohl beim Extrahieren mit Essigester als auch beim Ausmessen der Absorptionsmaxima im ultravioletten Spektralbereich. Erübrigte sich im vorliegenden Fall beim Extrahieren das Ansäuern, da der Most ohnedies sauer reagierte (siehe Analyse), so wurden bei der Aufnahme des Spektrums versuchsweise die methanolischen Lösungen mit 1 Tropfen Salzsäure versetzt. Die Farbe schlug nach rosarot um (vorher zwiebelgelb), und die Maxima im UV prägten sich besser aus. Bei 540 nm trat auch im sichtbaren Bereich ein Maximum auf (Abb. 1).

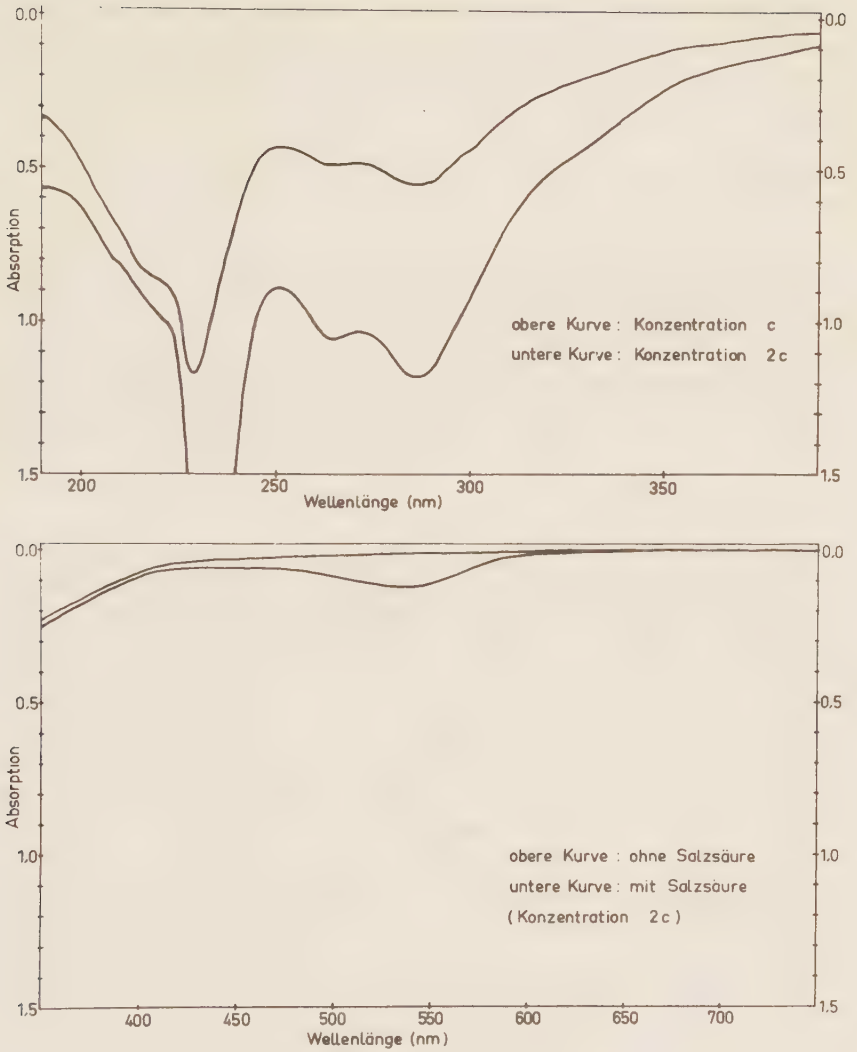


Abbildung 1: Absorptionsspektrum des Essigesterextrakts aus dem Most

Eine dreistündige Extraktion von 450 ml Most mit 200 ml Essig-ester im Perforator bei 145 bis 155 Torr aus dem siedenden Wasserbad führte zu einem dunkelroten Perforat; der Ester wurde abgedampft (Heizplatte).

2.) Ausschüttelung.

Gleichzeitig wurden 450 ml Most 4 mal mit je 200 ml Essigester je 1 min lang geschüttelt. Wegen der Emulsionsbildung war die Trennung der Phasen nur durch Anlegen eines Vakuums und nachfolgendes langes Absitzenlassen zu erreichen. Es resultierte ein zunächst tiefgelber, nach der vierten Ausschüttelung praktisch farbloser Extrakt. Der Ester wurde im Vakuum abdestilliert.

3.) Vergleich der Extrakte.

Die Rückstände der beim Ausschütteln und beim dreistündigen Perforieren gewonnenen Extrakte lösten sich in Methanol, das 1% Salzsäure enthielt, mit roter Farbe, die bei der schonend ausgeschüttelten Probe heller war als bei dem Perforat. Die Tatsache, daß die im Spektrophotometer 137 UV (Perkin-Elmer) in 1 cm-Quarzkuvetten meßbare Konzentration (bei der sämtliche Maxima im meßbaren Extinktionsbereich liegen) beim Perforatrückstand $x:2000$, beim Ausschüttelrückstand dagegen erst $x:5000$ war, läßt, zusammen mit der tieferen Farbe des Perforats, auf Veränderungen schließen, die bei der weniger schonenden Aufarbeitung stärker auftraten als bei der schonenden. Dies ist der in der Einleitung beschriebenen Kondensation der Monomeren, sowie der Farbstoffbildung aus Leucoanthocyanidinen zuzuschreiben. Die Lage der Absorptionsmaxima entsprach fast genau derjenigen einer d-Catechin-Vergleichslösung; allerdings fehlte dort die Schulter um 265 nm.

c) Spektren von Catechinlösungen.

Eine 0,0025%ige Lösung von d-Catechin in Methanol, das 1% HCl enthielt, zeigte Extinktionsmaxima bei 230 und 280 nm. Hier, wie auch beim Mostextrakt, ist stets das um 280 nm auftretende Maximum schwächer ausgeprägt als das bei kürzeren Wellenlängen

liegende. Trotzdem wird es bei der Bestimmung und beim Nachweis von Polyphenolen vorzuziehen sein, da es für sie einigermaßen spezifisch ist. Immerhin aber ist es vor einer quantitativen Bestimmung zweckmäßig, seine genaue Lage für den jeweils zu untersuchenden Stoff zu ermitteln. So fanden *Owades*, *Rubin* und *Brenner* (21) das Maximum im Bier bei 270, im Tee bei 275 nm, *Margheri* (23) mißt im Wein bei 275 nm, desgleichen *Colagrande* (17) den Essigesterextrakt von Wein bei 275 nm gegen den Methanolextrakt aus schwarzem Tee als Bezugssubstanz, und in dem zu untersuchenden angesäuerten Mostextrakt wurde, wie bereits erwähnt, das Maximum bei 286 nm gefunden. Auch *Freudenberg* und *Weinges* (7) fanden bei allen Vertretern dieser Stoffklasse ein Maximum zwischen 270 und 285 nm und einen starken Anstieg der Absorption unterhalb 245 nm.

Nach 3-monatiger Aufbewahrung der Catechinlösung war die Kondensation zu Gerbstoff so weit fortgeschritten, daß die ursprünglich farblose Lösung braungelb geworden war und eine vollständige Änderung in der Lage der Absorptionsmaxima festgestellt werden mußte (Abb. 2).

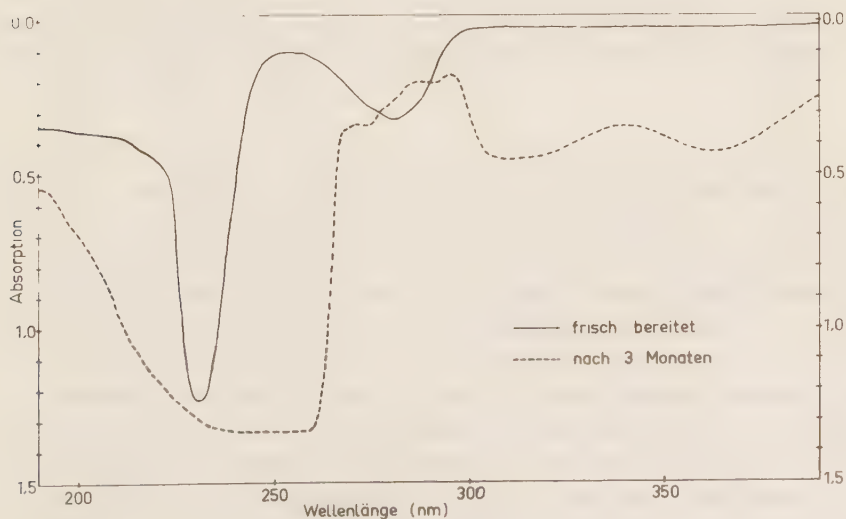


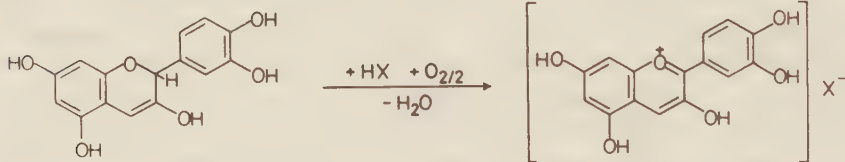
Abbildung 2: Veränderung des Absorptionsspektrums einer sauren Lösung von d-Catechin

Diese Beobachtung veranschaulicht die Unsicherheit der Gerbstoffbestimmungsmethoden; ist doch das zur Auswertung herangezogene Maximum nun völlig verschwunden, während an anderen Stellen neue Maxima auftreten, die keinen Bezug zur Vergleichssubstanz d-Catechin mehr erkennen lassen, obwohl diese doch Ausgangsstoff der erfolgten Kondensation war und auch der Lebensmittelgerbstoff aus solchen Kondensaten bestehen soll (siehe Einleitung).

d) Versuche zur Farbstoffentfernung.

Der Essigesterextrakt hatte sich, wie geschildert, auch bei vorsichtigem Einengen (Vakuum bei Zimmertemperatur) stets nach rot hin verfärbt. Die Lösungen der Rückstände färbten sich auf Zusatz von Säure ebenfalls intensiver. Beide Erscheinungen sind auf die Umwandlung von Leucoanthocyanidinen in Anthocyanidine zurückzuführen; im ersten Fall scheint die saure Reaktion der Polyphenole selbst die Reaktion hervorzubringen.

Der Reaktionsverlauf dürfte sich folgendermaßen darstellen lassen:



Leucoanthocyanidin

Anthocyanidin

Farbstoffe werden sich demnach in leucoanthocyanidinhaltigen Extrakten immer dann bilden, wenn Säure und Luftsauerstoff - sei es auch nur in geringer Menge - zugegen sind. Letzteren völlig auszuschalten, dürfte sich in dem beschriebenen Aufarbeitungsgang (extrahieren, einengen, lösen) kaum durchführen lassen; für die präparative Gewinnung des Weingerbstoffs stellte sich daher folgende Alternative: Entweder werden die Leucoanthocyanidine durch Säurezusatz und Wärmezufuhr quantitativ in Farbstoffe übergeführt, oder es wird nach einer Möglichkeit

gesucht, die auch beim schonenden Aufarbeiten entstehenden Anthocyanidinanteile als "Verunreinigungen" zu entfernen. Ist der letztere Weg wegen seiner Unsicherheit hinsichtlich des Ausmaßes der Farbstoffbildung unbefriedigend, so verbietet sich der erste wegen der zu erwartenden parallel laufenden Phlobaphenbildung, die auch den Catechinanteil angreift (siehe Einleitung), erst recht. Deshalb sollte im Folgenden eine Entfernung der Farbstoffe aus dem Extrakt versucht werden.

Diese ist wegen der Kationennatur der Anthocyanidine mit Hilfe eines Kationenaustauschers möglich: Die Farbstoffe werden zurückgehalten, während die Gerbstoffe den Austauscher passieren. Auf diese Weise hat S e n g e w a l d (24) Malvin von verunreinigenden Gerbstoffen befreit; der umgekehrte Weg, nämlich die Aufarbeitung des Austauschereluats statt des -adsorbats, schien im vorliegenden Falle gangbar.

Auf 90 ml des Kationenaustauschers Duolite C 25 (Benckiser) in seiner H^+ -Form, präpariert in einer Säule von 2,5 cm Durchmesser, wurde die rote Lösung eines 4 mal je 2 min lang mit je 200 ml Essigester aus 500 ml Most ausgeschüttelten Extraktes, dem im Rotavapor R (Büchi) aus dem handwarmen Wasserbad der Ester entzogen wurde, aufgegeben. Lösungsmittel waren 10 ml Methanol und 1 ml 25%ige Salzsäure; die Lösung wurde mit Wasser auf 50 ml verdünnt.

Bei einer Abtropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sec lief ein hellgelbes Eluat ab, während sich der Austauscher in seiner oberen Zone durch festgehaltenen Farbstoff rot anfärbte. Das Eluat färbte sich von der Oberfläche her in wenigen Minuten wieder rot; der Rückstand war nach dem Abziehen des Lösungsmittels wieder ebenso rot wie vor der Austauscherbehandlung.

Diese Erscheinung zeigt die außerordentliche Empfindlichkeit und Reaktionsfähigkeit der Leucoanthocyanidine, welche die Anwendung der grundsätzlich möglichen, eleganten Abtrennung der Farbstoffe von den Gerbstoffen durch Kationenaustauscher im vorliegenden Fall verbietet. Geringere Schwierigkeiten ließen sich

bei der Aufarbeitung der Trester erwarten, die bereits kondensierte Gerbstoffe in größerer Menge als der Preßmost enthalten.

II. Die Trester.

a) Extraktion und Entfetten.

Bei der Extraktion der Trester kann man auf das im Vergleich zum Essigester wesentlich bessere Extraktionsmittel Methanol zurückgreifen, da das bei der Mostextraktion entscheidende Problem der Mischbarkeit mit Wasser hier nicht besteht.

Die getrockneten und zerkleinerten Trester (etwa 2,5 kg) wurden im Soxhlet-Extraktor in Portionen zu je 0,5 kg mit Methanol erschöpfend extrahiert. Der Extrakt war zunächst braun, später hellgrün, was darauf hindeutete, daß nunmehr nur noch die in Methanol schwach löslichen Lipide der Kerne und Kämme anfielen. Der Gehalt an lipophilen Substanzen im Extrakt war beträchtlich, so daß eine Ausschüttelung mit Petroläther notwendig wurde. Der im Rotavapor vom Methanol befreite Extrakt wurde mit etwa 1 l Wasser aufgenommen und 6 mal mit Petroläther ausgeschüttelt. Die starke Emulsionsbildung machte ein Zentrifugieren nach jedem Ausschüttelvorgang notwendig. Es fielen an: 1,2 l dunkelbraunrote wäßrige Phase, etwa 50 g grüner pastöser Lipidanteil und eine hellbraune cremige Mittelschicht unlöslicher Verbindungen.

b) Vorversuche am Extrakt.

Die fettfreie wäßrige Phase wurde zur Vorbeugung gegen Pilzbefall zunächst mit 1 g/l Kaliumpyrosulfit versetzt, später noch mit einer geringen Menge Toluol überschichtet.

1.) Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab einen Gehalt von 152,7 mg/100 ml N, das entspricht 954,3 mg/100 ml Eiweiß (= 0,95%). Die Gegenwart von Eiweiß spielte wahrscheinlich neben der Phlobaphenbildung bei der später beobachteten kontinuierlichen Ausscheidung eines hellbraunen, nicht kristallinen

Niederschlag eine Rolle.

2.) Das UV-Absorptionsspektrum des auf meßbare Stärke verdünnten Extrakts, aufgenommen im Spektrophotometer 137 UV (Perkin-Elmer), zeigte in wäßriger Lösung Maxima bei 200 und 275 nm, in methanolischer bei 226 und 275 nm und in 1% HCl enthaltender methanolischer Lösung ebenso bei 226 und 275 nm, jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel gemessen (Abb. 3).

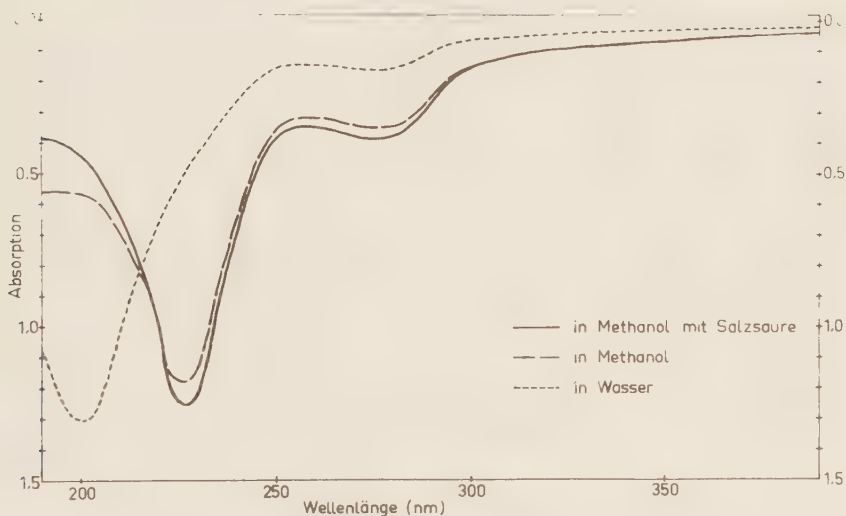


Abbildung 3: UV-Absorptionsspektrum des Tresterextrakts

3.) Die B u r k h a r d t sche Vanillinreaktion führte im sichtbaren Spektralbereich zur Ausbildung eines Maximums bei 490 (gegen Wasser gemessen), bzw. bei 505 nm (gegen vanillinfreien Blindwert gemessen), während der vanillinfreie Blindwert selbst (gegen Wasser gemessen) nur ein nicht auswertbares, nahezu kontinuierliches Abnehmen der Extinktion nach längeren Wellenlängen hin zeigte (Abb. 4). Das bedeutet, daß im Tresterextrakt (Blindwert) auf Säurezusatz offenbar nur wenig oder keine Anthocyanidine gebildet werden, weil die entsprechend reagierenden Leucoanthocyanidine (vgl. Most!) hier bereits zu Gerbstoffen kondensiert sind. Die Lage des Maximums wurde für

die quantitative Auswertung der Vanillin-Salzsäure-Reaktion am Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) nachgeprüft und bei 503 nm bestätigt. Diese Festlegung war notwendig, da Bestimmungen des Catechinwertes an diesem Gerät, nicht, wie nach B u r k - h a r d t (9), an einem Stufenphotometer durchgeführt werden sollten.

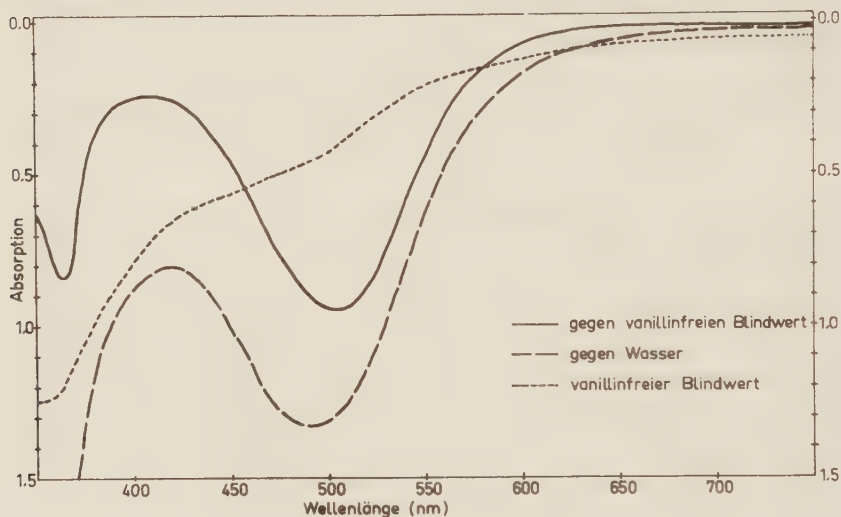


Abbildung 4: Vanillin-Salzsäure-Reaktion des Trestereextrakts

4.) Die seit langem bekannte Möglichkeit, Phenole an Polyamid zu chromatographieren (25) (26), haben verschiedene Forscher benutzt, um phenolische Naturstoffgemische gleichzeitig aufzutrennen und von störenden Nebenbestandteilen zu befreien. So reinigten H ö r h a m m e r, W a g n e r und L e e b (27) flavonhaltige Extrakte, D i e m a i r, P o s t e l und S e n g e w a l d (28) die Farbstoffe roten Hybridenweins; G r a s s m a n n, E n d r e s, P a u c k n e r und M a t h e s (29) gliederten das Aglucongemisch des essigesterlöslichen Fichtenrindengerbstoffs auf, und E n d r e s (30), sowie E n d r e s und H ö r m a n n (31) geben in ihren Arbeiten über die Polyamidchromatographie eine ganze Fülle von Beispielen solcher Trennungen. Stets wird betont, daß sich das Verfahren insbesondere gut zur quantitativen Abtrennung der störenden

Gerbstoffe eigne, die selbst nach Methanolelution der Säule am Polyamid haften blieben (27). Die starken Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gerbstoff und Polyamid sind von der gleichen Art wie die zwischen Gerbstoff und Eiweiß, so daß sich in der Gerbstoffadsorption an Polyamid geradezu ein Modellfall für wichtige Gerbvorgänge sehen läßt. Die Affinität des Gerbstoffs zum Polyamid nimmt dabei mit der Zahl der phenolischen Hydroxylgruppen zu (32).

Seit einiger Zeit versucht man, diese Erkenntnisse auf die Kellertechnik anzuwenden und die hinsichtlich der Gerbstoffentfernung oftmals unbefriedigende Gelatineschönung durch eine Polyamidbehandlung des Weines zu ersetzen. Eingehende Untersuchungen über die technischen Möglichkeiten und Grenzen dieses Verfahrens haben W u c h e r p f e n n i g und B r e t t h a u e r veröffentlicht (33). Sie stellten fest, daß zur Erzielung eines milden Geschmacks je nach Beschaffenheit (d.h. Gerbstoffgehalt) des Weines im allgemeinen 2 - 5 g Polyamid/l zugesetzt werden müssen; ein weiterer Zusatz wirkt sich geschmacklich negativ aus, da zuviel Gerbstoff entfernt wird und die Weine "leer und nichtsagend" werden. Dabei wird bereits in den ersten 10 min Kontaktzeit der Hauptanteil des Gerbstoffs adsorbiert. Anschließend wird vom Polyamid abfiltriert.

Die Angabe, daß das Polyamid mittels 0,2%iger Natronlauge regeneriert werden könne, indem sich eine schwarzbraune Waschlauge ablöse, veranlaßte zu eigenen Versuchen, den Gerbstoff auf ähnlichem Wege von den übrigen Extraktbestandteilen zu trennen. Die Lösung der Wasserstoffbrückenbindung im alkalischen Medium ist dadurch zu erklären, daß der Wasserstoff der aromatischen Hydroxylgruppe von dem stärker nucleophilen Hydroxylion fester gebunden wird als von dem weniger nucleophilen freien Elektronenpaar der Amidgruppe (32). So ist es auch möglich, Leder mit Lauge zu entgerben.

In einem Vorversuch bestätigte sich zunächst die Adsorptionskraft des Polyamids gegenüber den Gerbstoffen des Tresterextrakts. 5 ml Extrakt wurden im Reagensglas mit einer Spatelspitze Poly-

amidpulver für Dünnschichtchromatographie nach S t a h l (E. Merck, Darmstadt) geschüttelt. Die vorher braune Lösung heilte sich nach gelb hin auf, und das vorher weiße Pulver nahm eine braune Färbung an.

c) Fraktionierung an einer Polyamidsäule.

Auf eine mit dem oben angegebenen Polyamidpulver vorbereitete Säule von 5 cm Höhe und 1 cm Durchmesser wurden 25 ml einer farbstofffreien Gerbstofflösung gegeben. Diese wurde erhalten, indem 50 ml des fettfreien Tresterextraktes durch den Kationenaustauscher Duolite C 25 (Benckiser) geschickt und mit dem zum Nachwaschen benötigten Wasser auf 200 ml aufgefüllt wurden. Der Durchlauf durch die sehr feinkörnige Säule (das Material ist nicht für Säulenchromatographie gedacht) wurde durch Anlegen einer Wasserstrahlpumpe erreicht. Die Durchlaufzeit betrug für 25 ml etwa 90 min. Das Eluat war hellgelb, die Säule in der oberen Zone von 2 mm Breite rotbraun, im übrigen hell rotbraun. Eluat und Waschwasser wurden vereinigt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Die Säule wurde sodann in der oben beschriebenen Weise mit 0,2%iger Natronlauge ausgewaschen, wobei sich die adsorbierten Gerbstoffe sofort ablösten. Das Eluat war dunkelbraun und von alkalischer Reaktion ($\text{pH} = 10$). Es wurde mit Waschwasser auf 100 ml aufgefüllt. Durch Aufgeben von 50 ml dieser Lösung auf den Austauscher C 25 wurden die freien Phenole in wäßriger hellgelber Lösung von schwach saurer Reaktion erhalten ($\text{pH} = 5$). Auch hier wurden Eluat und Waschwasser vereinigt und auf 100 ml aufgefüllt.

Zur Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums lagen vor:

- 1.) Farbstofffreier fettfreier Tresterextrakt; 4 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts,
- 2.) Lösung der nicht adsorbierten Gerbstoffe; 16 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts,
- 3.) alkalische Lösung der adsorbierten Gerbstoffe; 16 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts,

- 4.) neutralisierte Lösung der adsorbierten Gerbstoffe; 32 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts.

Um vergleichbare und meßbare Lösungen zu erhalten, wurden verdünnt:

- 1a) 5 ml 1.) auf 100 ml,
- 2a) 20 ml 2.) auf 100 ml,
- 3a) 20 ml 3.) auf 100 ml,
- 4a) 40 ml 4.) auf 100 ml.

Bei 275 nm wurden im Spektrophotometer 137 UV (Perkin-Elmer) in 1 cm-Quarzküvetten folgende Extinktionen gemessen:

für 1a) $E = 1,06$

für 2a) $E = 0,61$

für 3a) nicht auswertbar

für 4a) $E = 0,51$

Die Messungen erfolgten gegen Wasser.

Nimmt man ein gleiches oder ähnliches Absorptionsvermögen der in 2a) und 4a) gelösten Substanzen an, dann ließe die Messung den Schluß zu, daß eine Säule der verwendeten Art unter den angegebenen Bedingungen weniger als die Hälfte des aufgegebenen Gerbstoffs zurückhält. Die Lösung 3a) war erwartungsgemäß für Vergleiche im gegebenen Rahmen wegen ihrer alkalischen Reaktion nicht auswertbar.

d) Adsorption durch Schütteln mit Polyamidpulver.

Auf einer Schüttelmaschine wurden 25 ml des fettfreien, farbstofffreien Tresterextrakts (Lösung 1) einmal mit 250 mg, ein anderes Mal mit 2,5 g Polyamidpulver je 1 Std lang geschüttelt. Die beim Aufarbeiten anfallenden Lösungen wurden wie unter c) benannt; die Lösung 3 wurde hier jedoch sofort als ganze über den Austauscher gegeben.

Es lagen vor:

- 1.) Farbstofffreier, fettfreier Tresterextrakt; 4 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts,

- 2.) nicht adsorbierte Gerbstoffe; 8 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts, da auf 50 ml verdünnt wurde,
- 4.) adsorbierte Gerbstoffe; 16 ml entsprechen 1 ml fettfreien Tresterextrakts, da auf 100 ml verdünnt wurde.

Zur Messung wurden verdünnt:

- 1a) 5 ml 1.) auf 100 ml,
- 2a) 10 ml 2.) auf 100 ml,
- 4a) 20 ml 4.) auf 100 ml.

Im Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) wurden bei 275 nm in 1cm-Quarzküvetten folgende Extinktionen gemessen:

für 1a) $E = 0,89$

Bei Behandlung mit 250 mg/25 ml (10 g/l):

für 2a) $E = 0,75$

für 4a) $E = 0,21$

Bei Behandlung mit 2,5 g/25 ml (100 g/l):

für 2a) $E = 0,45$

für 4a) $E = 0,46$

Beim letzten Versuch wurden also etwa gleiche Teile adsorbiert und nicht adsorbiert; beim ersteren ist das Verhältnis noch viel ungünstiger. Für präparative Zwecke erscheint daher das Schüttelverfahren ungeeignet, zumal mit 100 g/l bereits die Grenze erreicht ist, oberhalb derer sowohl das Schütteln als auch das Filtrieren wegen der voluminösen Beschaffenheit des Pulvers unmöglich werden.

Solche Grenzen sind der Säulenadsorption nicht gesetzt, sofern durch die Verwendung eines nicht allzu feinkörnigen Pulvers auch beim Verlängern der Säule der Durchfluß nicht behindert ist. Entsprechende Versuche mit gröberen Pulvern führten später zu einer Methode, den Gerbstoff des Weines von den anderen Weinbestandteilen zu trennen. Die Kontrolle der Reinigungsschritte erfolgte dabei chromatographisch; die Methode wurde mit dem Gerbstoff der Trester entwickelt.

e) Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie.

1.) Polyamid.

Es lag nahe, zunächst die Chromatographie auf Polyamidschichten zu versuchen, zumal das Mercksche Präparat im Prospektmaterial der Firma zwar nicht ausdrücklich zur Gerbstoffanalyse, so doch zur Trennung von Phenolen und phenolischen Substanzen empfohlen wird. Die Erfahrungen auf dem Gebiet der Polyamid-Dünnschichtchromatographie sind noch nicht groß; Anregungen zu Trennversuchen (34) (35) gehen meist auf die Erfolge der Chromatographie an Polyamidsäulen zurück (27) (29).

Zunächst wurde Polyamid zum Imprägnieren von Papier für die Papierchromatographie von Phenolen empfohlen (36). Die ersten Erfolge auf Dünnschichten verzeichneten D a v i d e k und P o k o r n f (37) in der Auftrennung phenolischer Antioxydantien, E g g e r (38) in der von Flavonolglykosiden; und B i r k h o f e r und Mitarbeiter (39) trennten Anthocyanidine auf Polyacrylnitril-Perlon-Schichten. Eine interessante Beschichtungstechnik teilten in neuerer Zeit W a n g und L i n (40) mit: Sie lösen Polyamid in 80%iger Ameisensäure, geben die Lösung auf Glasplatten und lassen das Lösungsmittel zunächst verdunsten und dann durch Erhitzen der Platten abdampfen. Auf den so erhaltenen praktisch kornfreien Schichten chromatographierten sie phenolhaltige Pflanzenextrakte mit Benzol, Chloroform, Essigester und Aceton. E g g e r und K l e i n i g (41) benutzten Polyamidschichten zur Trennung von Lipochinonen.

Zur Auffindung geeigneter Fließmittel für die Auftrennung der Bestandteile des Tresterextrakts wurden zunächst Lösungsmittel aus dem polaren Bereich der eluotropen Reihe in Ringvorproben getestet. Die Arbeitsweise war folgende: Verteilt in Abständen von etwa 5 cm über die ganze Fläche einer mit Polyamidpulver (Merck) beschichteten Glasplatte von 20 mal 20 cm Größe wurden mit einer Kapillare kleine Flecken von Tresterextrakt aufgetragen und mit einem Föhn angetrocknet. Das zu testende Fließmittel wurde aus einer dreifach gebogenen Kapillare (Abb. 5),

deren Spitze auf die Mitte des aufgetragenen Flecks gesetzt war, auslaufen gelassen. Dabei breitet es sich ringförmig auf der Platte aus und liefert ein kleines Rundchromatogramm. Es genügt, bis zum Durchmesser von etwa 4 cm zu entwickeln. Man kann sich dann bereits gut über die Trennleistung des Fließmittels orientieren, ohne allzuviel Zeit und Material aufwenden zu müssen.



Abbildung 5: Auftragekapillare, verwendbar zum Entwickeln kleiner Rundchromatogramme

Geprüft wurden:

1. Essigester,
2. Aceton-Chloroform (3+7),
3. Methanol-Isopropanol (1+1),
4. Methanol,
5. Methanol-Wasser (1+1),
6. Methanol-Wasser-Ameisensäure (5+4+1),
7. Wasser.

Geeignet erschienen die Fließmittel 2 bis 6. Essigester ist zu apolar, Wasser schwimmt die Schicht von der Platte.

Im aufsteigenden System wurden auf Streifen von 5 mal 10 cm näher untersucht:

2. Aceton-Chloroform (3+7),
6. Methanol-Wasser-Ameisensäure (5+4+1),
8. Methanol-Wasser-Ammoniak 10% (5+4+1),
9. Methanol-Essigester-n-Natronlauge (5+3+2),
10. Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5+4+1), von S t a h l und S c h o r n (42) zur Auftrennung von Gerbstoffen auf Kieselgel-G-Schichten empfohlen.

Geeignet erschienen die Fließmittel 6, 8 und 9; denn nur bei ihnen kam es zu einem Transport der aufgetragenen Substanz.

Bei 6 waren Anreicherungen bei $R_f = 0,6$ bis $0,75$ erkennbar, bei 8 Anreicherungen bei $R_f = 0$ und $0,8$. Bei 9 waren keine Anreicherungen festzustellen, aber eine vollständige Auftrennung, kontinuierlich von $R_f = 0$ bis 1 verlaufend (Schwanzbildung ohne Flecken). Auch bei 6 und 8 traten stets lange Schwänze auf. 2 und 10 trennten nicht.

Die Trennversuche auf Polyamidschichten verliefen wenig befriedigend, da das Ziel einer jeden Chromatographie, das zu trennende Substanzgemisch in scharf abgesetzte Flecken aufzugliedern, nicht erreicht werden konnte. Außerdem ist die Handhabung der Polyamidplatten beim Auftragen und Entwickeln schwierig wegen der schlechten Haftfestigkeit des Adsorbens auf der Platte.

Das Abblättern der Schicht beim Auftragen wäßriger Lösungen kann weitgehend vermieden werden, indem man die Platte an der Seite der Startlinie in das Fließmittel taucht und 2 cm laufen läßt, mit dem Föhn leicht antrocknet und dann erst aufträgt (38). Ferner lassen sich Verletzungen der Schicht beim Auftragen vermeiden, indem man die Platte bis auf eine schmale Startlinie abdeckt und die Probeflösung mittels eines inerten Gases aufsprüht. Allerdings bleibt dabei die aufgetragene Menge unbekannt, und es geht viel Probeflösung verloren.

2.) Kieselgel.

Das von S t a h l und S c h o r n (42) angegebene Fließmittel 10 (Chloroform-Essigester-Ameisensäure 5+4+1) wurde auch, entsprechend der Vorschrift, auf einer Kieselgel-G-Platte ausprobiert. Der Versuch führte zu einer recht guten Trennung in Zonen bei $R_f = 0$, $0,05$ und $0,3$ und veranlaßte dazu, auf Kieselgelschichten unter Verwendung des neu entwickelten gipsfreien Kieselgels H (E. Merck, Darmstadt) die Polarität des Fließmittels schrittweise zu steigern, um so eine bessere Auftrennung des Gerbstoffgemischs zu erreichen.

Untersucht wurden in Streifenchromatogrammen (5 mal 10 cm) folgende Fließmittel:

11. Aceton-Essigester-Ameisensäure (5+4+1),
12. Aceton-Methanol-Ameisensäure (5+4+1),
13. Aethylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (5+4+1),
14. n-Butanol-Eisessig-Wasser (6+2+2).

Trennergebnisse:

- 11: $R_f = 0, 0,05, 0,3$,
- 12: $R_f = 0, 0,6, 0,8$ bis $0,9$, dazwischen Schwanzbildung,
- 13: $R_f = 0, 0,5, 0,9$, dazwischen Schwanzbildung, aber Flecken
schärfer als bei 12,
- 14: $R_f = 0, 0,3, 0,7$, Schwanzbildung von $R_f = 0$ bis $0,3$.

Die Ergebnisse veranlaßten zu einem Hauptversuch mit Fließmittel 13. Auf eine Platte (20 mal 20 cm) wurde eine 3 mm breite Startlinie nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgesprüht.

Trennergebnis:

$R_f = 0$ rotbraun,
 $R_f = 0,1$ bräunlich,
 $R_f = 0,4$ graugelb,
 $R_f = 0,9$ dunkel graublau mit gelblichem oberen Saum. Die Zonen waren recht gut ausgeprägt; zwischen $R_f = 0,1$ und $0,4$ war eine schwache Schwanzbildung festzustellen.

Auf Kieselgel HF 254 mit Fluoreszenzindikator (E. Merck, Darmstadt) wurden neben den beschriebenen 4 Zonen beim Betrachten im ultravioletten Licht durch Fluoreszenzlöschung 2 weitere bei $R_f = 0,5$ und $0,9$ sichtbar.

Um die einzelnen Fraktionen für nähere Untersuchungen anzureichern, wurde in einem größeren Chromatographiertank gleichzeitig auf 5 Platten insgesamt 1 ml fettfreier Tresterextrakt mit Fließmittel 13 entwickelt. Die Zonen bei $R_f = 0, 0,12, 0,48$ und $0,84$ wurden abgeschabt und mit Wasser, dann Methanol eluiert. Eine spektrophotometrische Differenzierung der Fraktionen erwies sich als nicht möglich, da die Maxima der UV-Absorptionsspektren bei allen Fraktionen an den gleichen Stellen lagen (226 und 275 nm).

Eine weitere Möglichkeit der Anreicherung bietet das Entwickeln

der um 90° gedrehten Platte mit 10%iger Ameisensäure. Entwickelt man von jeder Seite der Platte her je 2 mal bis zur Mitte, so werden die Bänder zu Flecken in der Mitte der Platte zusammenge-
waschen:

Rf = 0 rotbraun,

Rf = 0,1 hellbraun,

Rf = 0,2 hellbraun,

Rf = 0,3 dunkel graubraun,

Rf = 0,4 graugrün,

Rf = 0,5 graugrün,

Rf = 0,7 braungrün,

Rf = 0,8 blaugrau mit gelblichem Obersaum.

Dazwischen wurden kleinere Flecken sichtbar, die aus der Schwanzbildung beim ersten Entwickeln herrühren und erst in der Anreicherung erkennbar werden. Durch erneutes Entwickeln mit Fließmittel 13 in der Originalrichtung läßt sich der gelbe Obersaum von Rf = 0,8 auf Rf = 0,9 abtrennen.

Die Flecken wurden abgeschabt und das Pulver jeweils mit einer Mischung von 1 ml Wasser, 1 ml Methanol und 3 Tropfen Ameisensäure extrahiert. Die Gerbstoffe gingen weitgehend in Lösung.

Auf Probestreifen (5 mal 10 cm) wurden die extremen Fraktionen hinsichtlich ihrer Polarität nochmals einzeln untersucht.

Fraktion Rf = 0: Wasser-Methanol-Ameisensäure (5+4+1) entwickelt mit der Front, ist also zu polar. Aethylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (5+4+1) entwickelt nicht, ist also zu apolar.

Fraktion Rf = 0,9 bis 1: Beide Fließmittel sind zu polar; die Substanz läuft mit der Front.

Die Fraktionen Rf = 0 bis Rf = 1 enthalten Substanzen nach zunehmender Polarität geordnet. Fließmittel zur Auftrennung des Gesamtgemischs müssen apolarer sein als Wasser-Methanol-Ameisensäure (5+4+1). Das Fließmittel Aethylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (5+4+1) = Nr. 13 steht hinsichtlich seiner Polarität in der Mitte: Fraktion Rf = 0 erfordert zur Chromatographie ein Fließmittel größerer, Fraktion Rf = 1 eines geringerer Polarität.

III. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Trennversuche am Gerbstoff der Maische haben gezeigt, daß bei der präparativen Darstellung des Rotweingerbstoffs ein Gemisch sehr vieler verschiedener Substanzen (Dünnschichtchromatogramme) mit ähnlichen Eigenschaften (UV-Spektren, Adsorptionsverhalten) zu erwarten ist. Ihre Isolierung aus dem Wein erscheint möglich durch Ausschütteln mit Essigester oder Adsorption an Polyamid, eine Orientierung über ihre Konzentration mit Hilfe der Vanillin-Salzsäure-Färbung.

Es dürfte sich bei diesen Substanzen im wesentlichen um verschiedene Kondensationsstufen der monomeren Grundverbindungen handeln (Polaritätsunterschiede bei Übereinstimmung der UV-Absorptionsspektren). Sie sind während des Aufbereitens wegen ihrer Kondensationsneigung und Säureempfindlichkeit schonend zu behandeln. Eine analytische Aufgliederung ist mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel H unter Verwendung eines Fließmittels der Art Äthylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (5+4+1) möglich. Das Verfahren dürfte bei der Reinheitsprüfung der Hauptfraktion ($R_f = 0$) wertvolle Dienste leisten.

Untersuchung des Weines.

I. Analyse.

Dichte, pyknometrisch:	0,9950
Gesamtextrakt, pyknometrisch:	27,6 g/l
Alkohol, pyknometrisch:	94,4 g/l = 12,34 Vol%
Zucker:	2,77 g/l
Zuckerfreier Extrakt:	25,83 g/l
pH, potentiometrisch:	4,0
Gesamtsäure, potentiometrisch:	4,0 g/l, ber. als Weinsäure
Asche:	3,26 g/l

II. Isolierung des Gerbstoffgemischs.

Aufbauend auf den bei der Untersuchung der Maische gemachten Erfahrungen richteten sich die Untersuchungen am Wein direkt auf die Isolierung des Gerbstoffs. Verbesserungen an den bisher entwickelten und benutzten analytischen Methoden ergaben sich aus der speziellen Problematik der einzelnen Aufarbeitungsschritte, also im Rahmen der Isolierungsversuche. Sie werden deshalb im Folgenden nicht in einem gesonderten Abschnitt zusammengefaßt, sondern an den entsprechenden Stellen des Isolierungsgangs behandelt.

a) Ausschüttelung.

500 ml Wein wurden im Rotavapor bei 25° C vom Alkohol befreit und 8 mal mit je 200 ml Essigester ausgeschüttelt. Der Ester wurde im Rotavapor bei 25° C abgezogen, der rote Rückstand mit 10 ml Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde, tropfenweise aufgetragen, auf Kieselgel-H-Schichten mit den gleichen Fließmitteln chromatographiert, wie sie zum Auftrennen des Tresterextrakts benutzt wurden.

Trennergebnisse:

Fl. 10: Gute Abtrennung gelber, grauer und brauner Anteile in scharfen Zonen zwischen $R_f = 0,5$ und $0,8$ vom rotbraunen Startpunkt.

Fl. 13: $R_f = 0,4$ hellrot, $R_f = 0,6$ rotviolett bis blaurot. Oberhalb $R_f = 0,6$ bis etwa $R_f = 0,9$ blaugraue bis braune Bärte.

Rotbraune Anteile zwischen $R_f = 0$ und $0,4$, wie sie im Tresterextrakt beim Entwickeln mit Fl. 13 auftraten, scheinen im Weinextrakt nicht vorhanden zu sein. Die mit Fl. 10 oberhalb $R_f = 0,5$ abtrennbaren Anteile sind mit den im Tresterextrakt dort gefundenen identisch. Ihre Auftrennung gelingt mit Fl. 13 nicht; dieses eignet sich dagegen gut zum Differenzieren einiger am Startpunkt verbliebener Substanzen.

Deshalb kann die gleiche Platte zunächst mit Fl. 10, nach an-

schließender Föhntrocknung mit Fl. 13, aber nur bis $R_f = 0,5$, entwickelt werden. Das Ergebnis ist dann eine vollständige Aufgliederung der Bestandteile des Essigesterextrakts aus Rotwein in ziemlich scharf voneinander abgesetzte Zonen. Noch schärfer wird die Trennung, wenn man jeweils mehrfach entwickelt; Anregung und Begründung für dieses Verfahren gibt H a l p a a p (43), der es für die präparative Schichtchromatographie anwendet.

Versuche, das für diesen Zweck noch etwas zu polare Fließmittel 13: Aethylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (5+4+1) apolarer zu gestalten, führten über das Fließmittel 15: Aethylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (7+2+1) zu dem Fließmittel 16: Aethylmethylketon-Aethanol-Ameisensäure (7+2+1).

Chromatographievorschrift.

Auf die Startlinie einer 0,2 mm dicken Schicht von Kieselgel H (Merck) - 20 mal 20 cm - werden 0,2 ml des mit 10 ml Methanol aufgenommenen roten Rückstandes vom Essigesterausschüttelextrakt aus 500 ml Rotwein streifenförmig aufgetragen. Man entwickelt 3 mal mit Fließmittel 10: Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5+4+1) bis zur Steighöhe von 18 cm ab Unterkante der Platte. Nach jedem Entwicklungsvorgang trocknet man mit dem Föhn bis zum Verschwinden des Säuregeruchs.

Es folgt 2-maliges Entwickeln bis zur Steighöhe von 11,5 cm ab Unterkante der Platte mit Fließmittel 16: Aethylmethylketon-Aethanol-Ameisensäure (7+2+1). Man erhält folgende Auftrennung (x bis xxxx veranschaulicht die Farbintensität der Bänder):

Start 1,0 cm	blaß dunkelrot	xx
3,0 cm	grau	xx
4,5 cm	orange	xx
7,0 cm	purpurrot	xxxx
9,0 cm	purpurrot	xx
10,0 cm	grau	xx
10,5 cm	orange	xxx

11,0 cm ockerfarben	xxx	
12,0 cm gelb	xxx	
12,5 cm blaugrau	xxx	
13,5 cm grau	xxx	
15,0 cm graubraun	xx	
16,5 cm gelblichbraun	x	(vgl. Abb. 6)

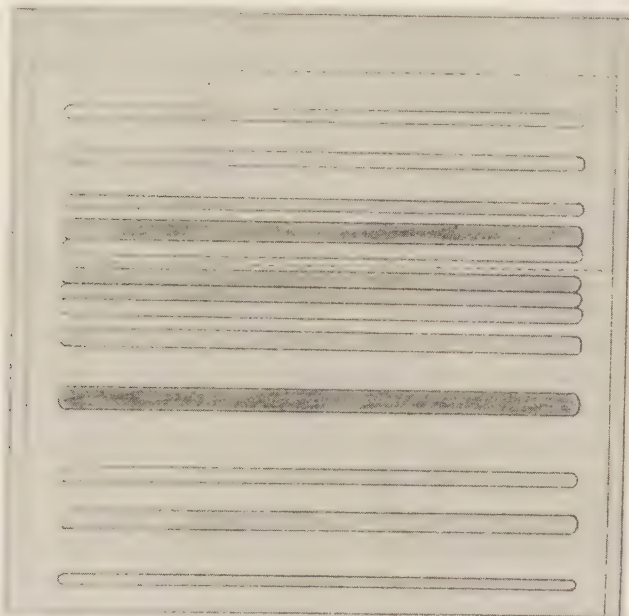


Abbildung 6: Mehrfach entwickeltes Chromatogramm des Essigester-extrakts aus dem Wein (schematisch)

Bei anderer Aktivität der Schicht können Abweichungen auftreten; man entwickelt dann mit Fließmittel 16 natürlich nur bis zum Beginn der mit Fl. 10 scharf abgesetzten, starken Grau- und Gelbbänder der oberen Plattenhälfte. Das nachfolgende Entwickeln mit Fl. 16 dient lediglich der Auftrennung der am Startpunkt verbliebenen Substanzen und der besseren Ausprägung der Streifen in der unteren Plattenhälfte. Dieser Weg wurde beschritten, weil die sonst in solchen Fällen übliche Elution der am Startpunkt verbliebenen Substanzen nach dem Abschaben der Schicht von der Plat-

te (zur Chromatographie auf einer neuen Schicht) nicht vollständig möglich war. Die beim punktförmigen Auftragen der zu trennenden Substanz mögliche zweidimensionale Chromatographie wird unter II b 1.) beschrieben. Die hier verwendete Platte war 45 min lang bei 110° C aktiviert und dann einen Tag lang über Silicagel aufbewahrt worden. Platten, die sofort nach dem Aktivieren verwendet werden, liefern niedrigere, Platten, die länger aufbewahrt oder nicht aktiviert werden, höhere Rf-Werte.

b) Adsorption - Desorption.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche knüpften an die Untersuchungen an, die in dem Abschnitt über den Gerbstoff der Trester geschildert wurden. Es mußte möglich sein, die Adsorbierbarkeit von Gerbstoff an Polyamidpulver zu einer Methode der quantitativen Abtrennung des Rotweingerbstoffs von den übrigen Weinbestandteilen auszubauen. Zum Überprüfen dieser Frage dienten ein Nylonpulver der Firma Polypenco GmbH (Köln), und das Perlونpulver "Divergan SZ 9010" der Firma Badische Anilin- und Soda-fabrik (Ludwigshafen). Beiden Firmen sei an dieser Stelle für die Überlassung der Pulver gedankt.

1.) Gewinnung des Gesamtadsorbats durch Desorption.

Wie ein Vorversuch zeigte, ist eine Säule von 1 cm Durchmesser, die mit feuchtem Nylonpulver bis zur Höhe von 25 cm gefüllt ist, in der Lage, 20 ml Wein praktisch vollständig zu entfärben. Auf der Säule bleibt dabei oben ein brauner Ring von 1 mm Breite, darunter ein roter von 10 mm Breite zurück. Das Adsorbat ist mit 0,2%iger Natronlauge leicht eluierbar. 1%ige Ammoniaklösung hat den gleichen Effekt.

20 g Nylon (Polypenco) und 20 g Perlون (BASF) wurden mit Wasser zu Suspensionen angerührt und in je eine Säule von 2,5 cm Durchmesser, die unten mit Glaswatte verschlossen war, eingeschlämmt. Nach dem Absitzenlassen der Suspensionen betrug die Höhe der Säulen etwa 12,5 cm. Bei dem sehr feinkörnigen Nylon-Präparat wurde zur Erzielung einer akzeptablen Tropfgeschwindigkeit (100

ml in etwa 45 min) wiederum das Anlegen einer Wasserstrahlpumpe notwendig; die mit dem gröberen Perlons gefüllte Säule lief bereits ohne Vakuum etwas schneller als die Nylonsäule mit Vakuum, so daß ihre Tropfenfolge der der Nylonsäule angeglichen werden konnte.

Auf jede Säule wurden nun 100 ml Wein gegeben und mit Wasser nachgewaschen, bis das Gesamtluat 250 ml betrug. Die Eluate waren fast farblos. An der Nylonsäule verblieb ein brauner Ring von 2, darunter ein roter von 20 mm Breite. Die Adsorbatzonen an der Perlonsäule waren etwas breiter, die Adsorptionskraft des Perlons erschien also etwas geringer.

Das Ablösen der adsorbierten Gerb- und Farbstoffe von den Säulen wurde mit je 50 ml 1%iger Ammoniaklösung begonnen. Unter Farbumschlag wanderten sehr dicht hintereinander violette, dunkelgrüne und braune Zonen. Es zeigte sich jedoch, daß die Zonen der Adsorption als blaßbraune Bänder an den Säulen erkennbar blieben. Da eine unvollständige Desorption angenommen wurde, wurden nacheinander aufgegeben: je 50 ml 0,2%iger, 50 ml 1%iger und 50 ml 2%iger Natronlauge. Waren auch die natronalkalischen Eluate zunächst noch gefärbt, so mußte doch festgestellt werden, daß nicht das gesamte Adsorbat desorbierbar war, sondern geringe Reste an den Zonen der Adsorption offensichtlich irreversibel zurückgehalten wurden bzw. in Alkali nicht mehr löslich waren. Diese Erscheinung sollte in der Folge bei jedem neuen Versuch beobachtet werden; eine Untersuchung hierüber wird unter II b 2.) beschrieben.

Während die Säulen zur weiteren Verwendung mit viel Wasser laugefrei gewaschen wurden, wurden die nicht adsorbierbaren Anteile des Weines im Rotavapor bei 25° C auf je 200 ml eingeeengt, desgleichen die Lösungen der Adsorbate nach dem Neutralisieren der Lauge mit Ameisensäure auf pH = 4 (Farbumschlag nach rubinrot).

Die Vanillin-Salzsäure-Reaktion nach Burkhardt (9) war für die Adsorbatlösung stark positiv ($E = 0,242$ bei 1 cm-Glasküvetten, 503 nm, Zeiss Spektralphotometer PMQ II), für die Eluatlösung schwach positiv ($E = 0,030$). Der Versuch zeigte, daß die Hauptmenge der catechinartig reagierenden Stoffe, also mit OH-

Gruppen in m-Gruppierung (9), vom Polyamid festgehalten worden war.

Chromatographie.

Die Ammonium- und Natriumformiat enthaltenden (siehe oben) Adsorbatlösungen wurden quantitativ mit Essigester ausgeschüttelt und die mit Methanol aufgenommenen Rückstände auf Kieselgel H chromatographiert. Durch 3-maliges Entwickeln mit Fließmittel 10 bis zur Steighöhe von 15 cm ab Start wurde eine sehr gute Auftrennung in 15 Zonen (einschließlich Startzone) erreicht. Die wäßrigen Ausschüttelrückstände trennten sich nicht in Zonen. Die an Perlon und Nylon durch Adsorption-Desorption gewonnenen Fraktionen ließen keine vollständige Identität mit dem unter II a durch direktes Ausschütteln aus dem Wein gewonnenen Extrakt erkennen, waren dagegen untereinander völlig identisch.

Es zeigte sich, daß Perlon und Nylon für das zu behandelnde Trennproblem als Sorptionsmittel von gleichem Wert sind, während durch direktes Ausschütteln des Weines mit Essigester ein abweichend zusammengesetztes Gemisch erhalten wird.

Im zweidimensionalen Verfahren wurde der punktförmig aufgetragene Gerbstoff zunächst 3 mal mit Fließmittel 10 und dann, nach Drehung der Platte um 90° , 2 mal mit Fließmittel 16 entwickelt. Mit Fl. 10 erfolgte eine Auftrennung in 11 Zonen, mit Fl. 16 trennte sich der am Startpunkt verbliebene Rest in weitere 6 einschließlich Start, der starke graublaue Fleck (um R_f 0,7) in 2 Flecke. Alle Flecke, die sich mit Fl. 10 entwickeln ließen, wanderten mit Fl. 16 mehr oder weniger mit der Front, desgleichen das stets auftretende braune Band zwischen den Flecken. Das dadurch auftretende Verwischen der Zonen veranlaßte dazu, zum zweiten Entwickeln einen Keilstreifen aus der Schicht herauszuschaben und durch Abtrennen der Schicht neben den bereits entwickelten Flecken ihr erneutes Laufen zu verhindern. Die Versuchsanordnung veranschaulicht Abb. 7.

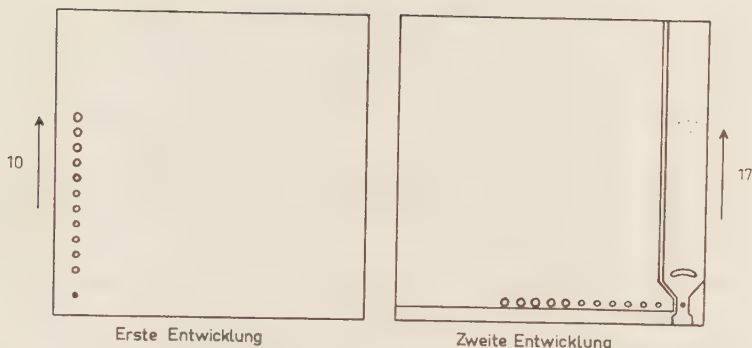


Abbildung 7: Variation einer zweidimensionalen Chromatographie

Außerdem wurde versucht, das zur Entwicklung der Farbstoffe immer noch zu polare Fließmittel 16 durch eines geringerer Polarität zu ersetzen.

Untersucht wurden:

16. Aethylmethylketon-Aethanol-Ameisensäure (7+2+1),
17. Aethylmethylketon-Essigester-Ameisensäure (7+2+1),
18. Aethylmethylketon-n-Propanol-Ameisensäure (7+2+1).

Die rote Farbstoff-Hauptfraktion trennte sich bei 3-fachem Entwickeln mit Fl. 17 am besten vom Startpunkt, der als dunkelbrauner Fleck (Gerbstoff-Hauptfraktion) verblieb. Bei $R_f=0,8$ erschien beim Liegen der Platte an der Luft allmählich eine braune Zone. Sie dürfte durch Selbstkondensation einer mit Fl. 17 abgetrennten farblosen Gerbstoffvorstufe entstehen.

Diese Beobachtung veranlaßte zu Versuchen, auch beim Chromatographieren des Gerbstoffgemischs einen Säureeinfluß zu vermeiden und ein neutrales Fließmittel ausfindig zu machen, das eine ebenso gute Auftrennung bewirkte wie das saure Fließmittel 10.

Untersucht wurden:

19. Chloroform-Essigester-Methanol (5+4+1),
20. Chloroform-Essigester-Dimethylformamid (5+4+1),
21. Chloroform-Essigester-Acetonitril (5+4+1),
22. Chloroform-Essigester-Methanol (4+3+3),
23. Chloroform-Essigester-Methanol (5+3+2),
24. Chloroform-Acetonitril-Methanol (5+3+2),
25. Chloroform-Essigester-Methanol-Acetonitril (5+2+2+1).

Keines der untersuchten Fließmittel besaß die Trenneigenschaften des Fl. 10. Noch am besten erschienen 19 und 23, doch ließ die Ausprägung der Zonen hinsichtlich ihrer Schärfe zu wünschen übrig. Offensichtlich ist die Ameisensäure als Fließmittelbestandteil unentbehrlich, weil sie die Dissoziation der Phenole zurückdrängt und sie infolge ihrer reduzierenden Eigenschaft vor oxydativer Veränderung an der großen Oberfläche der Dünnschichtplatte schützt. Um wenigstens auf die Arbeit des mehrfachen Entwickelns verzichten zu können, wurde versucht, das Fl. 10 polarer zu machen.

Untersucht wurden:

10. Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5+4+1),
26. Chloroform-Essigester-Methanol-Ameisensäure (5+3+1+1),
27. Essigester-Chloroform-Ameisensäure (5+4+1).

Fl. 26 trennte gut auf, doch war bei mehrfachem Entwickeln Fl. 10 noch immer besser. Fl. 27 bot einen guten Trenneffekt bei einmaligem Entwickeln. Eine Übersicht über die Trennleistung der drei Fließmittel gibt Abb. 8.

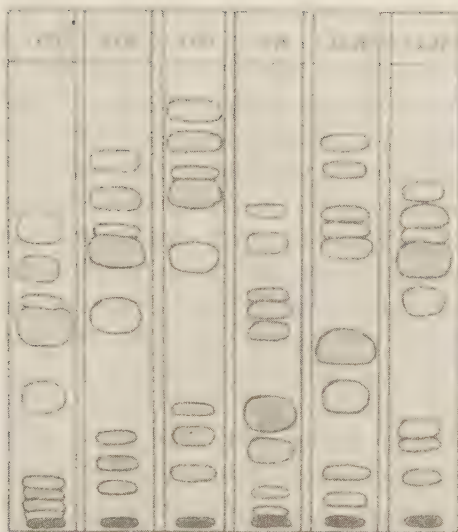


Abbildung 8: Trennleistung dreier Fließmittel

Bei der Verwendung neutraler Fließmittel fiel auf, daß der bei Fl. 10 kräftig auftretende blaugraue Fleck um $R_f=0,7$ stets fehlte. Durch Ameisensäure wird die an dieser Stelle sitzende Substanz farblich verändert. Aufblasen von Ameisensäuredampf auf die entsprechende Stelle fertiger Chromatogramme, die mit neutralen Fließmitteln hergestellt wurden, führte zum Auftreten der blaugrauen Verfärbung. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß es sich bei dieser Substanz um ein Leucoanthocyanidin handelt, das mit Säure in ein bläuliches Anthocyanidin übergeht.

Zur Detektion farbloser oder in sehr geringer Menge vorhandener Substanzen erwies sich eine Mischung aus gleichen Teilen einer 1%igen Eisen^{III}-chloridlösung und einer 1%igen Kaliumferricyanidlösung als brauchbares Sprühreagens. Das Reagens kann auch für den Nachweis von Phenolen in Lösungen verwendet werden. Die starke Reduktionskraft der Phenole bewirkt eine augenblickliche Ausfällung von Berliner Blau, während andere reduzierende

Substanzen wesentlich langsamer reagieren.

2.) Untersuchung des nicht desorbierbaren Adsorbats.

Die oben beschriebene Beobachtung, daß nach der Desorption des Adsorbats vom Polyamid mit Natronlauge die Zonen der Adsorption an der Säule schwach sichtbar blieben, dort also wohl noch Substanzen zurückgehalten wurden, bestätigte sich in zahlreichen weiteren Versuchen. War das Ziel der Bemühungen zunächst die quantitative Gewinnung der mit Polyamid durch Wasserstoffbrückenbindung reagierenden Substanzen, so galt es nach Lösungsmitteln zu suchen, die auch die festesten Bindungen zu sprengen vermochten.

In der bereits erwähnten Arbeit von E n d r e s und H ö r m a n n (31) findet sich eine Verdrängungsreihe zum Lösen der Wasserstoffbrückenbindung in der Reihenfolge Wasser-Methanol-Aceton-Dimethylformamid, nach steigender Elutionskraft geordnet. Natronlauge bewirke sofortige Elution. Die von H ö r h a m m e r und W a g n e r (44) angegebene Reihe ist differenzierter und begreift die Natronlauge mit ein: Wasser-Aethanol-Methanol-Aceton-verdünnte Natronlauge-Formamid-Dimethylformamid.

Diese Lösungsmittel treten in Konkurrenz zu den vorhandenen Bindungen und können diese aufheben, indem sie sich selbst mit den bisher festgehaltenen Substanzen verbinden. Hierher gehören demnach alle Lösungsmittel, deren funktionelle Gruppen stärkere nucleophile Bindungskräfte entfalten, als sie die freien Elektronenpaare der Amidgruppen ausüben (vergleiche auch (32)). Einfache Phenole lassen sich vom Polyamid mit Wasser oder Alkohol ablösen, höhermolekulare (Gerbstoffe) nur noch mit Aceton, verdünnter Natronlauge, Formamid oder Dimethylformamid (44). Eine besonders starke Elutionskraft haben nach H ö r m a n n und v o n P o r t a t i u s (45) Mischungen aus Dimethylformamid, Eisessig, Wasser und Aethanol. Die Autoren trennten damit 2,4-Dinitrophenylaminosäuren und -peptide.

Auf die unter II b 1.) beschriebene Nylonsäule wurden 50 ml Wein

aufgegeben und mit Wasser nachgewaschen. Dimethylformamid löste einen großen Teil des Adsorbats vom Nylon; die Zone wanderte mit graubrauner Farbe und rotbraunem unteren Saum. Die Zonen der Adsorption waren nach der Elution noch erkennbar. Das Gemisch Dimethylformamid-Eisessig-Wasser-Aethanol (1+2+6+4) (4b) löste von dem verbliebenen Adsorbat eine rote Fraktion ab. Da auch nach dieser Elution die Adsorbazonen noch erkennbar blieben, wurde auf die an sich bewährte Natronlauge zurückgegriffen. Eine 1%ige Lösung von NaOH in Wasser eluierte erneut eine braune Fraktion, ohne jedoch die Säule vollständig vom Adsorbat reinigen zu können.

Die erneute Elution von Adsorbat durch die Natronlauge stellte die Gültigkeit der von H ö r h a m m e r und W a g n e r (44) aufgestellten eluotropen Reihe für das vorliegende Trennproblem in Frage; Alkali erschien nach wie vor als kräftigstes Eluens, wie dies auch E n d r e s und H ö r m a n n (31) angeben. Um diese Frage zu klären, wurde an einer weiteren Säule das Adsorbat zunächst mit Lauge abgelöst, hier mit 2%iger Ammoniaklösung. Das nachfolgend aufzugebene Aethanol eluierte nichts, auf Zusatz einiger Tropfen Ameisensäure eine sehr geringe Menge roter Substanzen. Methanol, Dimethylformamid und Essigester zeigten daraufhin keinen Elutionseffekt mehr. Stets verblieb eine blaßbraune Zone an der Stelle des Gerbstoffadsorbats.

Diese Zone, an der offenbar gewisse Substanzen irreversibel gebunden beziehungsweise in den verwendeten Lösungsmitteln nicht löslich sind, wurde in einem weiteren Versuch aus der Säule ausgeschlämmt, auf einer Glasfilternutsche grob vom Wasser befreit und im Exsikkator getrocknet. 100 mg dieser Masse wurden in Ameisensäure gelöst und auf 10 ml aufgefüllt, desgleichen 100 mg reines Polyamid und in einem dritten Kölbchen eine Spur (etwa 1/4 mg) reines d-Catechin zum Vergleich.

Im automatisch registrierenden Spektrophotometer 137 UV (Perkin-Elmer) wurden in 1 cm-Quarzküvetten die UV-Absorptionsspektren aufgenommen, und zwar:

1. d-Catechin gegen Ameisensäure,

2. Polyamid gegen Ameisensäure,
3. Polyamid-Adsorbat gegen Ameisensäure,
4. Polyamid-Adsorbat gegen Polyamid.

Catechin hat unter diesen Bedingungen ein sehr ausgeprägtes Maximum bei 278 nm und eine Schulter bei 255 nm, Polyamid Maxima bei 255 und 280 nm, wobei das erstere stärker ausgeprägt ist, das letztere schwächer und flacher verläuft.

Die Polyamid-Adsorbatlösung ließ sowohl bei der Messung gegen das reine Lösungsmittel als auch gegen die reine Polyamidlösung das beim Catechin beobachtete starke Maximum bei 278 nm vermessen; an dieser Stelle traten nur schwache Schultern auf, während bei 255 nm die Absorption stärker war. Nach dem Verlauf der Spektren kann vermutet werden, daß bei Vernachlässigung des Restadsorbats im Aufarbeitungsgang zumindest keine entscheidenden Mengen an Catechingerbstoff verloren gehen. Auf die Abwesenheit solcher Substanzen zu schließen, wäre hingegen bei der Ähnlichkeit der Spektren von Polyamid und Catechin nicht korrekt; und so muß die Frage offen bleiben, ob es sich beim Restadsorbat um hochmolekulare, in Alkali nicht mehr lösliche Phlobaphene oder um Substanzen handelt, die mit Polyamid zu neuen Verbindungen irreversibel reagieren, wie dies beispielsweise für Chinone beschrieben ist (30) (31) (32).

Die Beschäftigung mit der Elutionskraft verschiedener Lösungsmittel brachte aber auch andere, für die Weiterarbeit wichtige Konsequenzen und wird aus diesem Grunde eingehender geschildert.

Die beschriebene Arbeitsweise verfolgte den Zweck, ein Lösungsmittel aufzufinden, das nach dem Auswaschen der nicht an Polyamid adsorbierbaren Substanzen das gesamte Adsorbat möglichst quantitativ eluieren kann (Natronlauge oder Dimethylformamid oder Gemische nach H ö r m a n n und v o n P o r t a t i u s (45)). Danach wurde versucht, ob andere Lösungsmittel die verbliebenen Restadsorbate ablösen können, die gegebenenfalls mit der Hauptfraktion vereinigt werden sollten. Bisher noch nicht versucht wurde die schrittweise Desorption adsorbierter Substanzen mit den Lösungsmitteln der elutropen Reihen (31 oder 44), die entsprechend der Stärke der Bindung der einzelnen

Polyphenole an das Polyamid - also entsprechend der Zahl der OH-Gruppen pro Molekül (44) - das Gemisch in Fraktionen aufgliedern könnte. Die Fraktion, zu deren Ablösen das stärkste Eluens benötigt wird, müßte die am höchsten kondensierten Gerbstoffe enthalten. Eine Anreicherung, wenn nicht eine Reinigung der in dieser Fraktion vermuteten repräsentativen "Gerbstoff"-Komponente erschien nach diesem Verfahren nicht unmöglich.

3.) Aufgliederung des Adsorbats durch schrittweise Desorption.

Grundversuch.

Eine Säule von 1,6 cm Durchmesser wurde mit 10 g Nylon bis zur Höhe von 18,5 cm gefüllt. Als Verschuß diente wenig Glaswatte, darüber zur Vergrößerung der Abtropffläche eine Schicht grobes Glaspulver. Die Säule wurde mit 100 ml Wein beschickt und nacheinander eluiert mit:

1. 100 ml 12%igem Aethanol,
2. 125 ml 96%igem Aethanol,
3. 200 ml Methanol,
4. 200 ml Aceton,
5. 200 ml 0,2%ige Natronlauge,
6. 400 ml Wasser zum Auswaschen der Lauge,
7. 30 ml Dimethylformamid,
8. 130 ml Dimethylformamid-Eisessig-Wasser-Aethanol (1+2+6+4).

Die verwendeten Lösungsmittelmengen wurden von der Wanderungsgeschwindigkeit der jeweils abgelösten Adsorbatzonen bestimmt. Aufgefangen wurden Fraktionen von je 50 ml, die fortlaufend numeriert wurden. Sie wurden jeweils sofort im Rotavapor bei 35° C zur Trockne eingengt und die Rückstände, mit Methanol aufgenommen, auf eine Kieselgel-H-Platte möglichst konzentriert aufgetragen. Die Nachläufe der Methanol-, Aceton- und Natronlaugewäsche wurden zur Chromatographie zu größeren Fraktionen zusammengefaßt.

Entwickelt wurde auf ausgeschabten Streifen jeweils 1 mal mit Fließmittel 27: Essigester-Chloroform-Ameisensäure (5+4+1). Das erneute Laufen bereits entwickelter Streifen wurde vermieden

durch Abschaben der Schicht unterhalb der Startpunkte. Die fertigen Streifen wurden jeweils mit FeCl_3 /Ferricyanid besprüht.

Das Ziel der Auftrennung war neben der Prüfung der Elutionskraft der verschiedenen Lösungsmittel die Gewinnung einer Gerbstofffraktion, die bei stark aufgetragenem Startpunkt auch nach dem Besprühen mit FeCl_3 /Ferricyanid möglichst keine Abtrennung von Flecken in höheren R_f -Bereichen erkennen läßt, also frei von Monomeren ist.

Das Ergebnis der chromatographischen Prüfung der gewonnenen Fraktionen gibt Abb. 9 wieder; der Trennungsgang selbst verlief wie folgt:

Fraktion 1 ist farblos, der Rückstand gelb, honigartig. Er enthält den von phenolischen Bestandteilen befreiten sogenannten Extrakt des Weines. Mit Methanol läßt sich ein gelber Anteil auslaugen. Er wird zur Chromatographie verwendet.

Fraktion 2 ist rosa; die rote Farbstoffzone an der Säule läuft unter dem Einfluß des 12%igen Aethanols langsam und verwaschen weiter. Methanol löst aus dem Rückstand einen bräunlichen Anteil.

Fraktion 3 ist rosa, der Rückstand bräunlich, der in Methanol lösliche Anteil desgleichen.

Fraktion 4 ist rosa und frei von "Extrakt". Der rote Rückstand löst sich in Methanol.

Fraktion 5 ist kirschrot; mit Aethanol hatte sich eine rote Zone scharf abtrennen lassen. Der rote Rückstand löst sich in Methanol.

Fraktion 6 ist hellrot, sonst wie die vorige.

Fraktion 7 ist rosa; eine deutliche Zone scheint sich vom Polyamid mit Methanol nicht abzutrennen. Der schmutzigrote Rückstand löst sich in Methanol.

Fraktion 8-9 ist blaßorange; der Rückstand ist rot mit wenigen weißlichen Kristallnadeln und in Methanol nicht vollständig löslich.

Fraktion 10 ist fast farblos, der Rückstand weißlich und in

Methanol schwer löslich.

Fraktion 11-14 ist schwach gelblich; die Acetonwäsche bewirkte keine Zonenwanderung. Der gelbliche Rückstand ist bis auf einen weißlichen Rest in Methanol löslich.

Fraktion 15, die Zwischenfraktion Aceton - Natronlauge, ist gelblich und etwas trüb, der Rückstand wachsartig weißlich. Methanol löst den gelblichen, Wasser den weißen Anteil, chromatographiert wurde der erstere.

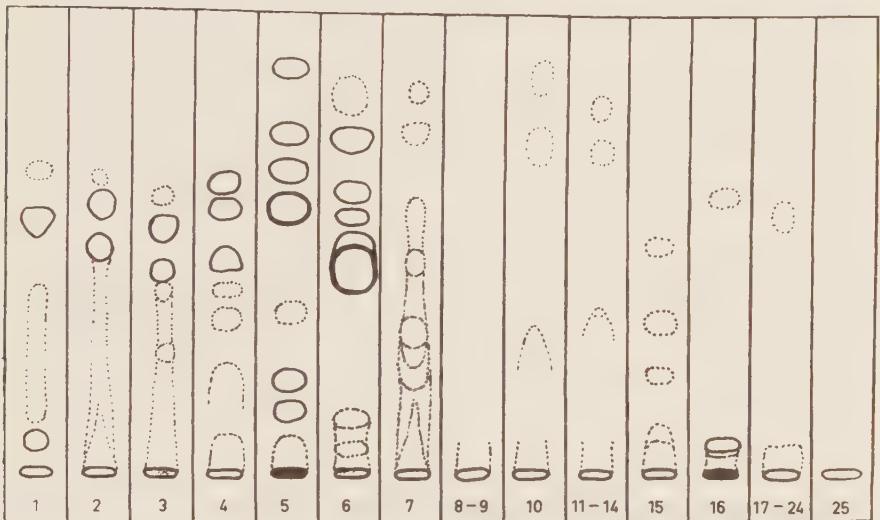


Abbildung 9: Chromatogramme der Eluatfraktionen des Grundversuchs

Fraktion 16, die Gerbstoff-Hauptfraktion, ist tiefbraun; die Zone war mit scharfer unterer Begrenzung gewandert, während die quantitative Elution nur verzögert vorstatten geht. Das Eluat wird mit Essigsäure auf pH = 7 gebracht. Der braune Rückstand löst sich teilweise in Methanol, der Rest in Wasser. Wie in Kontrollchromatogrammen gezeigt werden kann, sind sie chromatographisch identisch.

Fraktion 17-24 ist gelblich, der schmutziggelbe Rückstand löst sich bis auf den anorganischen Rest (Natriumacetat vom Neutralisieren der Lauge) in Methanol.

Fraktion 25-26, die Dimethylformamid-Eluate, sind gelb, der schmutziggelbe Rückstand löst sich in Methanol nicht, in Wasser nicht vollständig.

Fraktion 27-28, das Eluat aus dem Gemisch Dimethylformamid-Eisessig-Wasser-Aethanol (1+2+6+4), ist farblos und wird verworfen.

Aus dem Versuch wird gefolgert:

Von dem Adsorbat lassen sich mit Aethanol und Methanol die Farbstoffe, sowie der größte Teil der chromatographierbaren, also niedermolekularen Substanzen abtrennen. Eine nachfolgende Acetonwäsche ist offenbar unnötig. Natronlauge löst das fester gebundene, braune Adsorbat so weit vom Polyamid, daß auf ein Nachwaschen mit Dimethylformamid oder dem Gemisch Dimethylformamid-Eisessig-Wasser-Aethanol (1+2+6+4) verzichtet werden kann.

Das Polyamidpulver ist vor dem Gebrauch durch mehrmaliges Anschlammern mit Wasser und Dekantieren von löslichen Verunreinigungen und feinsten Anteilen zu befreien. Das Schlammern des Pulvers hat zur Folge, daß eine Verfestigung der oberen Säulenschicht durch zu feine Partikel vermieden wird und die Säule schneller läuft.

Probeversuche zum endgültigen Aufarbeitungsgang.

Auf eine Nyronsäule von 18,5 cm Höhe und 1,6 cm Durchmesser (= 10 g Pulver) wurde 1 l Wein aufgegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 25-30 sec/Tropfen. Die Kapazität der Säule reichte zur Adsorption der Farbstoffe nicht aus; das anfangs farblos abfließende Eluat war nach dem Passieren der gesamten Weinmenge rubinrot ohne Braunstich, während auf der Säule eine 6 cm breite braune Zone zurückgehalten wurde.

150 ml des Eluats, auf eine Säule gleicher Art gegeben, lieferten in der obren Schicht der Säulenpackung keinen braunen Ring; für die Adsorption der Gerbstoffe aus 1 l Wein scheint also eine Säule der oben angegebenen Ausmaße auszureichen. Der an der Kontrollsäule adsorbierte Farbstoff ließ sich mit Aethanol

praktisch quantitativ ablösen; die nachfolgende Methanolwäsche hatte einen schwachen, Aceton keinen weiteren Elutionseffekt.

Zur Reinigung des an der Originalsäule adsorbierten Gerbstoffs von Farbstoffen und Monomeren wurde der Farbstoff mit 200 ml 12%igen, dann 300 ml 96%igen Aethanols eluiert. Dabei wurde die untere Begrenzung der Gerbstoffzone unscharf, und 2 schmale Zonen trennten sich ab. Bei Verwendung großer Lösungsmittelmengen und unter großem Zeitaufwand dürfte es also möglich sein, am Polyamid auch eine Chromatographie der Polyphenole des Weines durchzuführen. Zweckmäßiger erschien es jedoch, die schrittweise Desorption mit Lösungsmitteln steigender Elutionskraft in der begonnenen Weise fortzuführen.

Als drittes Elutionsmittel trennte Methanol ein orangefarbenes Eluat ab, dessen roter Rückstand wieder wenige dünne weiße Kristallnadeln enthielt. In dieser Fraktion dürften sich demnach die kristallisierbaren Gerbstoffvorstufen befinden. Die Elution wurde bis zur Farblosigkeit des Extrakts fortgesetzt; dazu waren insgesamt 500 ml Methanol notwendig.

Das braunschwarze Eluat der nachfolgenden Alkaliwäsche (0,2% NaOH in Wasser, insgesamt 500 ml) wurde über dem Kationenaustauscher Duolite C 25 (Benckiser) vom Na^+ befreit. Das Austauschereluat war hellbraun mit schwachem Rotstich und reagierte sauer ($\text{pH} = 3$). Es wurde im Rotavapor bei 45°C eingengt, mit wenig Methanol in ein Kristallisierschälchen übergspült, im Vakuumtrockenschrank bei 45°C bis zur lackartigen Konstistenz getrocknet und zu einem dunkelbraunen Pulver zerrieben.

Da die Adsorbierbarkeit der Farbstoffe an das Polyamid durch die Elutionswirkung des im Wein enthaltenen Alkohols beträchtlich vermindert wurde, wurde ein Versuch mit Wein angesetzt, dem der Alkohol vor dem Aufgeben auf die Säule im Rotavapor bei 35°C entzogen worden war. Entsprechend der verwendeten Menge Wein (2 l) wurde dazu auch eine Säule mit einer größeren

Menge Polyamid (25 g Pulver) präpariert, in diesem Falle mit dem Perlon der BASF, weil in einer mit dem Nylon der Polypenco gefüllten Säule dieser Größe die Durchflußgeschwindigkeit wegen der feinkörnigen Beschaffenheit des Pulvers zu gering geworden wäre. Nach dem Schlämmen des Pulvers wurde eine Säulenpackung von 38 cm Höhe bei 1,6 cm Durchmesser erhalten.

Das Eluat des vorher vom Alkohol befreiten Weins war praktisch farblos; die Säule wurde mit 2 l Wasser nachgespült. 500 ml Aethanol lösten die rote Farbstofffraktion ab. Mit nachfolgend insgesamt 1,5 l Methanol gelang die praktisch quantitative Elution rot oder rötlich gefärbter Substanzen. Das Methanol-eluat wirkte am Schluß nur noch in Schichten von über 15 cm Dicke blaßorange. Die mit insgesamt 3 l 0,2%iger Natronlauge eluierten Gerbstoffe wurden wie beim 1-l-Versuch über dem Kationenaustauscher vom Na^+ befreit und in der beschriebenen Weise getrocknet. Die Ausbeute an der mit Natronlauge eluierten Fraktion betrug 0,7638 g/2 l, also 0,3819 g/l.

Versuche im präparativen Maßstab.

In gleicher Weise wurden auf einer Perlonsäule von 30 cm Höhe und 5 cm Durchmesser (200 g Pulver) 2 mal 5 l alkoholfreien Rotweins getrennt.

Die Säule wurde besonders sorgfältig präpariert: Auf ein kleines Knäuel Glaswatte, das die Abtropfkapillare verschloß, wurde eine Schicht von Glaspulver, das durch Schlämmen von feinsten Anteilen befreit worden war, mit Hilfe von Wasser so eingebracht, daß es die Rundung des Säulenendes vollständig anfüllte. Damit ergab sich eine Auslauffläche von 5 cm Durchmesser, die höhere Durchlaufgeschwindigkeiten erlaubt als die lediglich mit Glaswatte verschlossene Kapillare. Die Suspension des 24 Std lang in Wasser vorgequollenen Polyamids wurde vorsichtig in mehreren Anteilen in die Säule gefüllt und jedesmal absitzen gelassen, damit sich die feineren Teilchen nicht nur an der Oberfläche ansammeln und diese schwer passierbar machen konnten.

Mit insgesamt etwa 3 l Wasser wurde die fertige Säule durchgespült und dann der im Rotavapor bei 35° C von jeweils 500 auf etwa 300 ml eingeeengte Rotwein aufgegeben. Der über dem Polyamid befindliche Leerraum der Säule von etwa 2 l Fassungsvermögen wurde im Folgenden nach Möglichkeit gefüllt gehalten, da der hydrostatische Druck der überstehenden Flüssigkeit einen positiven Einfluß auf die Durchlaufgeschwindigkeit ausübt. Unter diesen Bedingungen liefen etwa 8 ml/min ab, bei Flüssigkeitsstand 0, das heißt kurz vor dem Einsickern in das Polyamid, etwa 6,5 ml/min. Bei Aethanol betrug die Durchlaufgeschwindigkeit nur etwa 4 ml/min, bei Methanol erheblich mehr, wurde aber auf die Geschwindigkeit des Weindurchlaufs gedrosselt. 0,2%ige Natronlauge lief so schnell wie der Wein oder Wasser.

Bei den beiden zu beschreibenden 5-l-Versuchen wurde nochmals deutlich, daß insbesondere mit Aethanol, aber auch schon mit Wasser, eine Chromatographie der lose adsorbierten Substanzen an der Polyamidsäule möglich ist (Abb. 10).

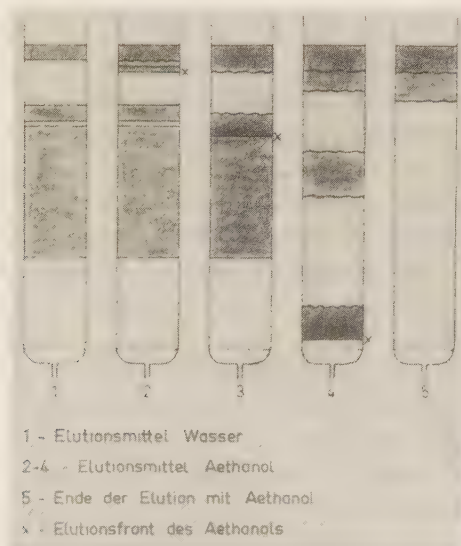


Abbildung 10: Die Desorptionswirkung des Aethanols

Da eine solche Auftrennung jedoch außerhalb der gestellten Aufgabe, die Gerbstoff-Hauptfraktion zu isolieren, lag, wurde sie nicht verwirklicht. Immerhin kann die Abb. 10 erklären, warum nach der Beendigung der Aethanol- und Methanolwäsche die jeweils letzten Anteile des Eluats nur als "praktisch farblos", nicht als "farblos" bezeichnet werden konnten. Die Beendigung insbesondere der Aethanolwäsche ist mehr oder weniger willkürlich, und auch die Elution mit Methanol würde bei genügender Ausdauer vielleicht schließlich noch zu einer Chromatographie der verbliebenen Gerbstoffe führen können. Indessen wurde für die Auftrennung der mit Natronlauge eluierten Substanzen später eine sehr viel bessere Möglichkeit gefunden, und die am Polyamid durchgeführte schrittweise Desorption wurde als Verfahren zur groben Abtrennung niedermolekularer Substanzen beibehalten.

Nach dem Passieren der 5 l Wein verblieb an der Säule ein Adsorbat, das von der Oberfläche an gerechnet bis etwa 3 cm braun, bis etwa 13 cm rot und bis etwa 20 cm blauviolett gefärbt war. Etwa 10 cm der Säule blieben weiß. Das Eluat war blaßorange.

Zunächst wurde mit 2 l Wasser der "Extrakt" von der Säule gewaschen. Die Farbe des Eluats änderte sich dabei von blaßorange auf blaßrosa, sobald die Säule extraktfrei war. Die letzten Anteile des Wassereluats waren praktisch farblos.

Zur zweiten Elution wurden im einen Fall 7, im anderen 8 l Aethanol verwendet, bis die in der Abb. 10 angedeutete violettrote Zone die Säule passiert hatte. Das Eluat war anfangs kräftig blaurot, später rubinrot und wurde allmählich blasser, bis es schließlich als "praktisch farblos" angesehen werden konnte. Sehr scharf war dabei die Abtrennung der violettroten Zone nicht, so daß auf eine getrennte Gewinnung dieser tatsächlich "chromatographierten" Zone verzichtet werden mußte.

Zur dritten Elution wurden im einen Fall 5, im anderen 6 l Methanol benötigt, ehe das anfangs rubinrote Eluat als "praktisch farblos" bezeichnet werden konnte. In Schichten von über 15 cm Dicke wirkten die Schlußfraktionen blaß roséfarben bis gelblich.

Die auf der Säule verbliebene, schon seit der Aethanolwäsche etwas unscharf gewordene Gerbstoffzone wurde mit 2 l 0,2%iger Natronlauge vom Polyamid abgelöst. Die sehr deutlich begrenzt laufende Fraktion erschien dabei nicht mit der Front, sondern etwa 20 cm hinter ihr. Die innerhalb dieser 20 cm Wanderungsstrecke abtropfende farblose Flüssigkeit reagierte neutral, da das in ihr ursprünglich vorhandene Na^+ zur Salzbildung mit dem Gerbstoff verbraucht worden war. Mit dem Erscheinen der braunschwarzen Gerbstofflösung am Auslauf der Säule verschob sich der pH von 7 über 8 nach 10 und darüber, sobald wieder Natronlauge im Überschuß vorhanden war. Die letzten Eluatfraktionen waren farblos.

Die alkalische Lösung wurde über dem Kationenaustauscher bei 2 Tropfen/sec vom Na^+ befreit. Das Austauschereluat war rotbraun bis blutrot. Ein Teil des Gerbstoffs fiel auf dem Austauscher aus, so daß dieser von Zeit zu Zeit aufgerührt und die trübe, sehr feine Suspension abgesehen werden mußte. Sie wurde mit dem klaren Eluat vereinigt.

Steht die mit Natronlauge beschickte Säule mindestens einen Tag lang still, so erhält man beim Nachspülen wieder ein bräunlich gefärbtes Eluat. Offenbar verläuft das Ablösen mancher Gerbstoffanteile nicht spontan. Dieses Nachwaschen läßt sich oft wiederholen, doch werden die Eluate immer dünner, ohne daß dabei die schon früher beobachtete an der Säule verbliebene Braunzone (II b 2.) verschwindet. Auch in den beschriebenen Versuchen wurden auf diese Weise einige Eluate gewonnen und als "Nachlauf" bezeichnet.

Sämtliche Fraktionen wurden im Rotavapor bei 35°C eingeengt, die Rückstände mit Methanol in Kristallisierschälchen übergespült und im Vakuumtrockenschrank bei 35°C bis zur lackartigen Konsistenz getrocknet. Die Rückstände blähen sich dabei meist auf und lassen sich anschließend leicht zu Pulver zerreiben.

Auswaagen:

	Aethanolfraktion	Methanolfraktion
1. Versuch:	2,9017 g	0,8232 g
2. Versuch:	2,6508 g	0,7346 g
	Natronlaugefraktion	Nachlauf
1. Versuch:	2,1808 g	0,5572 g
2. Versuch:	2,2569 g	0,6820 g

Ausbeute an Natronlaugefraktion (Gerbstoffgemisch) also:

1. Versuch:	0,4362 g/l,
2. Versuch:	0,4514 g/l.

c) Eigenschaften des Gerbstoffgemischs.

Die Eindampfrückstände der Natronlaugefraktionen sind lackartig und von dunkelbrauner Farbe, die bei den einzelnen Versuchen einen roten Schimmer von unterschiedlicher Intensität zeigt. Beim Erhitzen verlieren sie um 110° C Wasser und verkohlen dann allmählich, ohne zu schmelzen.

1.) Löslichkeit.

Aethanol	+	nicht vollständig
Wasser	++	nicht vollständig
Methanol	+++	nicht vollständig
Dimethylformamid	+++	verbliebener Bodenkörper im Überschuß allmählich löslich
5%ige Ammoniaklösung	++++	ohne Bodenkörper
1%ige Natronlauge	++++	ohne Bodenkörper

Eine Lösung von 10 mg Gerbstoffgemisch in 1 ml 1%iger Natronlauge kann tropfenweise mit verdünnter Essigsäure angesäuert werden, ohne daß der Gerbstoff wieder ausfällt. Auf diese Weise lassen sich 1%ige schwach saure Lösungen herstellen, die den Gerbstoff kolloidal gelöst enthalten. Säuert man mit Salzsäure statt mit Essigsäure an, dann trübt sich die Lösung.

2.) Chemische Reaktionen.

Geprüft wurde je 1 ml einer filtrierten 0,1%igen Lösung in Wasser.

+ 1 ml 10%iger Natronlauge	Dunkelfärbung, beim Erhitzen keine Änderung
+ 1 ml 12,5%iger Salzsäure	rotbraune Verfärbung, beim Erhitzen Trübung
+ 3 Tropfen Bleiessig	brauner Niederschlag
+ 1 ml 3%iger Silbernitratlösung	Trübung
+ 1 ml 3%iger Quecksilberacetatlösung	Trübung, beim Erhitzen brauner Niederschlag
+ 1 ml 7%iger Kupfersulfatlösung	grünliche Trübung, allmählich Niederschlag
+ 1 ml Fehlingscher Lösung	Grünfärbung, beim Erhitzen roter Niederschlag
+ 3 Tropfen 10%iger Eisenchloridlösung	dunkle Trübung, beim Erhitzen Niederschlag
+ 1 ml FeCl_3 /Ferricyanid	sofort blauer Niederschlag
+ 1 ml 1%iger alkoholischer Vanillinlösung + 2 ml rauchender Salzsäure	Rotfärbung

3.) Adsorptionsreaktionen.

+ 1 Spatelspitze Aktivkohle	nach kurzem Schütteln weitgehende Adsorption
+ 1 Spatelspitze Perlumpulver	nach kurzem Schütteln weitgehende Adsorption
+ 1 Spatelspitze Hautpulver	nach kurzem Schütteln starke Adsorption

4.) Reaktion mit Gelatinelösung.

Eine Lösung von 10 mg Gerbstoffgemisch in 1 ml 1%iger Natronlauge wurde mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure angesäuert (pH = 3-4) und mit 3 Tropfen einer 0,5%igen Gelatinelösung ver-

setzt. Diese erhält man, indem man 1 g Gelatine 24 Std lang in 200 ml Wasser vorquellen läßt und dann gelinde erwärmt, bis die Gelatine gelöst ist. Das Reagens wird nach dem Abkühlen verwendet (7).

Die Natronlauge-, sowie die Nachlaufraktionen sämtlicher Versuche schieden auf Gelatinezusatz braune Flocken ab. Essigsäure und Gelatine, sowie Essigsäure und Gerbstoff geben allein keine Fällung.

Die Aethanolfraktionen, in 3 Tropfen Methanol gelöst und mit Wasser auf 1 ml verdünnt, bleiben auf Gelatinezusatz klar, die Methanolfraktionen trüben sich, während die Natronlaugefraktionen auch unter diesen Bedingungen Niederschläge abscheiden. Methanol und Gelatinelösung allein ergeben keine Trübung.

Die Gelatine-Gerbstoff-Niederschläge lassen sich durch Zusatz von Natronlauge auflösen und durch Ansäuern wieder ausfällen.

5.) Vergleich mit Catechin.

Die charakteristischsten der aufgeführten Reaktionen wurden mit denen einer 0,1%igen Lösung von d-Catechin verglichen.

	Gerbstoff	d-Catechin
Natronlauge, Erhitzen	Dunkelfärbung	Braunfärbung
Salzsäure, Erhitzen	rotbraune Verfärbung	orangelgelbe Verfärbung, Trübung
Bleiessig	Niederschlag	Niederschlag
Eisenchlorid	Dunkelfärbung, Trübung	Grünfärbung, allmählich braun
FeCl_3 /Ferricyanid	sofort blauer Niederschlag	Grünfärbung, allmählich trüb
Vanillin-Salzsäure	Rotfärbung	starke Rotfärbung
Gelatine	Niederschlag	keine Veränderung

6.) Zusammenfassung der Ergebnisse.

Das aus der Natronlaugefraktion gewonnene Produkt löst sich gut in Natronlauge, läßt sich durch Schwermetallsalze ausfällen, an Aktivkohle, Polyamid und Eiweiß adsorbieren, kondensiert beim Erhitzen mit Mineralsäure zu unlöslichen Polymeren, wirkt stark reduzierend und reagiert mit Vanillin-Salzsäure unter Rotfärbung. Es weist damit alle Eigenschaften eines polyphenolischen Gerbstoffs auf.

Die Vanillin-Salzsäure-Reaktion beweist die Anwesenheit m-ständiger Hydroxylgruppen, die leichte Rotfärbung bei Säurezusatz die Anwesenheit von Stoffen des Leucoanthocyanidintyps. Gegenüber dem reinen monomeren Catechin fällt die Erhöhung der Reduktionskraft und die Verminderung der Farbtintensität bei der Vanillin-Salzsäure-Reaktion auf - beide Erscheinungen sind Folgen fortgeschrittener Kondensation. Deshalb ist auch zum Sichtbarmachen von Zonen echter Gerbstoffe auf Dünnschichtchromatogrammen das Universalsprühmittel FeCl_3 /Ferricyanid empfindlicher als Vanillin-Salzsäure.

7.) Chromatographisches Verhalten.

Die chromatographische Untersuchung des gewonnenen Gerbstoffgemischs sollte zunächst klären, wie weit durch das Auswaschen der Säule mit Aethanol und Methanol die Entfernung der Monomeren gelungen war, dann aber auch Aufschlüsse über eine vielleicht mögliche weitere Aufgliederung der Fraktion geben. Das erste Ziel ließ sich durch Chromatographie unter den bereits beschriebenen Bedingungen erreichen, das zweite erforderte Trennversuche mit neuen Fließmitteln und unter Umständen mit einer anderen Sorptionsschicht.

Auf eine Kieselgel-H-Platte wurden punktförmig nebeneinander aufgetragen: d-Catechin und die Aethanol-, Methanol- und Natronlaugefraktionen des 1- und 2-l-Versuchs, jeweils in Methanol gelöst. Nach dem Entwickeln mit dem Fließmittel 27: Essigester-Chloroform-Ameisensäure (5+4+1) bis zur Steighöhe von 15,5 cm

ab Start und Föhntrocknen bis zum Verschwinden des Säuregeruchs wurde mit FeCl_3 /Ferricyanid besprüht. Das Trennergebnis zeigt Abb. 11.

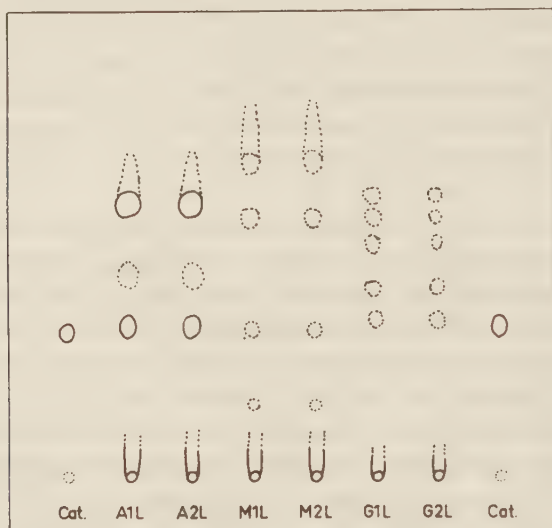


Abbildung 11: Chromatogramm der Fraktionen der Probeversuche mit Fließmittel 27

Die einander entsprechenden Fraktionen der beiden Versuche sind identisch. Catechin liegt im R_f -Bereich von Stoffen, die in allen Fraktionen auftreten; es dürfte sich, aus dem Fließverhalten zu schließen, bei den in scharfen Flecken abtrennbaren Substanzen also tatsächlich um Monomeren handeln. Die Natronlaugefraktionen sind von solchen Stoffen nicht frei.

Auf 2 weiteren Platten wurden jeweils die Aethanol-, Methanol-, Natronlauge- und Nachlaufraktionen der beiden 5-1-Versuche nebeneinander konzentriert aufgetragen. Eine Platte wurde mit Fließmittel 17: Aethylmethylketon-Essigester-Ameisensäure (7+2+1), die andere mit Fließmittel 27: Essigester-Chloroform-Ameisensäure (5+4+1) bis zur Steighöhe von jeweils 15,5 cm ab Start entwickelt. Diese beiden Platten wurden nach dem Entwickeln nicht besprüht. Das Trennergebnis zeigt Abb. 12.

Auch hier konnte Identität der einander entsprechenden Fraktionen nachgewiesen werden, und auch hier sind die Natronlaugefraktionen nicht frei von Monomeren. Diese Substanzen, die unter Fl. 17 fast mit der Front laufen, können durch Fl. 27 sehr schön aufgetrennt werden. Dagegen ist Fl. 17 in der Lage, aus dem Startbereich der alkoholischen Fraktionen einen violettroten Farbstoff scharf abzutrennen. Früher waren die Unterschiede in der Trennleistung von Fließmitteln unterschiedlicher Polarität zum mehrfachen Entwickeln der gleichen Platte mit zwei Fließmitteln ausgenutzt worden (siehe unter II a).

In allen beschriebenen Chromatogrammen wurden die Startflecken in geringem Umfang ohne Zonenbildung ausgewaschen (Bartbildung). Diese Erscheinung deutet darauf hin, daß das Entwickeln der Startzonen durch Fließmittel stärkerer Polarität Schwierigkeiten bereiten würde. Das bestätigte sich an einem Chromatogramm mit dem Gerbstoff (Natronlaugefraktion) des 1-1-Versuchs.

Wurde im Fl. 17 der Essigkester durch Methanol ersetzt, also mit Fließmittel 28: Aethylmethylketon-Methanol-Ameisensäure (7+2+1) gearbeitet, so wurde ein brauner Bart vom noch immer nicht vollständig wandernden Startpunkt bis zur Front erhalten.

Etwas besser war der Trennerfolg auf Cellulose-Schichten (hergestellt aus dem MN-Cellulosepulver 300 G der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren). Die Fraktionen eines 5-1-Versuchs wurden mit Fl. 17 wie üblich entwickelt. Bei allen Fraktionen wurde die Abtrennung einer gelben und gleich nachfolgend einer mehr oder weniger rötlichen Zone bis in Fronthöhe beobachtet. Wurde zum erneuten Entwickeln der gleichen Platte im Fl. 17 das Aethylmethylketon durch Aceton ersetzt, also mit Fließmittel 29: Aceton-Essigester-Ameisensäure (7+2+1) gearbeitet, so trennten sich erneut mit der Front wandernde Zonen von rötlicher Farbe ab. Nach wie vor blieb aber die Hauptmenge der aufgetragenen Substanz bei allen Proben am Startpunkt zurück.

R i b é r e a u - G a y o n und S t o n e s t r e e t (2)
haben in jüngster Zeit die Flavane eines Rotweins (Bordeaux)

durch zweidimensionale Papierchromatographie des Essigester-extraktes aufgetrennt und dabei das Auftreten eines breiten verwaschenen "Schweifens" vom Startpunkt her beobachtet. Diese Zone besteht nach den Untersuchungen der Autoren aus mehr oder weniger stark polymerisierten Leucoanthocyanidinen von ausgeprägtem Gerbstoffcharakter.

Die Übertragung der Chromatographievorschrift vom Papier auf die feiner und schneller trennende Cellulose-Dünnschichtplatte gelang ohne Schwierigkeit, gestattete jedoch auch in diesem Falle nicht die quantitative Elution des Startpunktes.

Auf eine Ecke einer Celluloseschicht (20 mal 20 cm) von 0,3 mm Dicke wurde punktförmig der in Methanol gelöste Gerbstoff eines 5-1-Versuchs aufgetragen. In der ersten Dimension wurde mit 2%iger Essigsäure, nach dem Trocknen der Platte mit dem Föhn in der zweiten Dimension mit der oberen Phase des Gemischs Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) entwickelt. Das fertige Chromatogramm wurde nach dem Trocknen mit dem Föhn mit FeCl_3 /Ferricyanid besprüht. Das Trennergebnis zeigt Abb. 13.

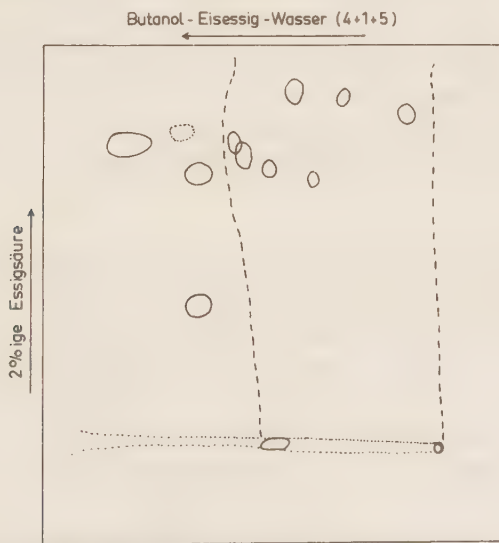


Abb. 13: Chromatogramm des Gerbstoffgemischs auf einer Celluloseschicht

III. Isolierung der Gerbstoff-Hauptfraktion.

Wie die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Gerbstofffraktionen gezeigt hat, konnte die Desorption mit Alkoholen nicht alle chromatographierbaren Substanzen aus dem Polyamid-Adsorbat entfernen. Die Natronlaugefraktionen enthielten noch immer Monomere. Das Ziel, eine reine, einheitliche Gerbstofffraktion zu isolieren, war bei der chemischen Ähnlichkeit der zu trennenden Substanzen eigentlich nur auf chromatographischem Wege erreichbar.

Am nächsten lag es, das auf Kieselgel-Dünnschichten mit Fließmittel 27 entwickelte Trennverfahren nach H a l p a a p (43) auf die Dickschichtplatte zu übertragen und die nach dem Entwickeln an der Startlinie zurückgebliebenen Substanzen zu eluieren.

a) Elution der Startzone.

Auf eine 2 mm dick mit Kieselgel PF 254 (E. Merck, Darmstadt) beschichtete Platte (20 mal 20 cm) wurden etwa 50 mg Gerbstoffpulver (Natronlaugefraktion), gelöst in 1 ml 1%iger Ammoniaklösung, streifenförmig aufgetragen. Nach einmaligem Entwickeln mit Fließmittel 27 bis zur Steighöhe von 13,5 cm ab Start wurde versucht, die an der Startlinie zurückgebliebenen Substanzen vom Kieselgel abzulösen.

Der Versuch, die Startzone nach dem Drehen der Platte um 90° mit einem geeigneten Lösungsmittel für den Gerbstoff zusammenzuwaschen und diesen über einen Abtropfzipfel aus Papier in Lösung zu gewinnen, schlug fehl. Zwar transportierte Dimethylformamid die braune Substanz bis in den Papierstreifen, doch kam dort die Wanderung zum Stillstand - vermutlich durch die Adsorbierbarkeit von Gerbstoff an Cellulose.

Ebenso unbefriedigend verlief der Versuch, den Gerbstoff aus dem Kieselgel der Startzone nach dem Abschaben von der Platte zu isolieren. Aus dem oben erwähnten Grund war es nicht möglich, das Pulver auf einem Papierfilter auszuwaschen: Soweit

aus dem mit Dimethylformamid sich bildenden Gel überhaupt etwas abtropfte, war das Eluat hell, während das Kieselgel braun blieb und auch das Papierfilter sich braun anfärbte. Wurde das Pulver in eine Säule gebracht und dort die Elution versucht, so verstopfte sich die Säule, und die Gewinnung eines Eluats gelang nicht.

Daraufhin wurde versucht, die ganze Kieselgelchromatographie von der Platte auf die Säule zu verlegen. Dazu wurde eine Säule von 1 cm Durchmesser bis zur Höhe von 10 cm mit Kieselgel von 0,2 - 0,5 mm Korngröße (E. Merck, Darmstadt) gefüllt. Eine kleine Menge des feingepulverten Gerbstoffs wurde oben aufgestreut und die Elution mit Fl. 27 begonnen. Die abtropfenden Fraktionen wurden in Mengen von je etwa 2,5 ml aufgefangen und die UV-Absorptionsspektren dieser Lösungen jeweils gegen das reine Fl. 27 als Vergleich aufgenommen. Insgesamt liefen 100 ml des Fließmittels durch die Säule.

Die Spektren waren in der Lage ihrer Maxima, wie nicht anders erwartet, untereinander praktisch identisch: Einem scharf ausgeprägten Maximum bei 255 nm folgte bei den ersten 25 Fraktionen eine allmählich immer schwächer sich ausbildende Schulter bei 263 bis 265 nm, sowie ein deutliches Minimum bei 268 nm. Die Stärke der Absorption nahm in der Reihenfolge der einzelnen Fraktionen allmählich ab; eine Elution deutlicher Zonen war nicht zu bemerken.

Die auf der Säule verbliebene Substanz wurde mit Dimethylformamid abgelöst. Die Lösung war tiefbraun, die Säule blieb hell bräunlich. Das Eluat und die vereinigten Waschfraktionen wurden im Rotavapor bei 60° C eingeeengt.

Das Dünnschichtchromatogramm des Gerbstoffs vor der Elution mit Fl. 27 war identisch mit dem des Gerbstoffs nach der Elution: Beide Gerbstoffe lieferten Flecke bei $R_f=0,2$ und $0,7$, sowie Bärte vom Start bis $R_f=0,1$. Das Eluat der Säulenspülung mit Fl. 27 lieferte das gleiche Chromatogramm wie der "gereinigte" Gerbstoff und der "ungereinigte", jedoch ohne den Fleck bei

$R_f=0,2$. Die Abtrennung der Monomeren auf diesem Weg war nicht möglich.

b) Chromatographie an einer Sephadex-Säule.

Im Zusammenhang mit dem Problem der Trubbildung in jungen Weinen haben sich W u c h e r p f e n n i g und F r a n k e (46) mit der Auftrennung von Weininhaltsstoffen durch Gelfiltration beschäftigt. Die Zielsetzung ihrer Arbeit war eine mehr technologische; die Anregung zur analytischen oder präparativen Verwendung der Methode vermochte sie trotzdem zu geben.

Die von P o r a t h und F l o d i n (47) entwickelte Chromatographie an Dextrangelen hat in den wenigen Jahren ihrer Anwendung eine Vielzahl von Stofftrennungen auf dem Gebiet der makromolekularen Chemie ermöglicht, wie aus der Dokumentation der Vertriebsfirma (Pharmacia, Uppsala, Schweden) hervorgeht. Eine Theorie der Gelfiltration wurde entwickelt, und D e t e r m a n n , sowie W i e l a n d und D e t e r m a n n modifizierten das Verfahren zu einer Methode der Dünnschichtchromatographie (48). Eine Schilderung der Anwendungsmöglichkeiten, sowie eine Beschreibung der Theorie und der experimentellen Praxis finden sich in einem Übersichtsbericht von D e t e r m a n n (49), sowie im Kapitel "Gelfiltration" des 2. Bandes von R a u e n s Biochemischem Taschenbuch (50).

D e t e r m a n n (49) unterscheidet dabei je nach dem Effekt der Methode die Gelfiltration, bei der Moleküle beträchtlichen Größenunterschieds getrennt werden (Entsalzen von Eiweißlösungen), und die Gelchromatographie, bei der Molekülfraktionen geringeren Größenunterschieds in chromatographische Zonen aufgliedert werden. Auf dem Gebiet der Gelchromatographie liegen dann auch die Arbeiten, die das Verfahren für das vorliegende Problem interessant machen.

So studierte bereits vor der erwähnten Arbeit von W u c h e r p f e n n i g und F r a n k e (46) W o o f die analogen Verhältnisse im Bier (51) - hier wie auch im Wein besteht die

Polyphenolkomponente im wesentlichen aus Leucoanthocyanidinen -, und B o s e r , v o n E i c k s t e d t und G i e r t z (52) gliederten im Zusammenhang mit einer pharmakologischen Untersuchung Kondensationsprodukte von Flavonoiden auf, und zwar Produkte der Säurekondensation von l-Epicatechin und d-Catechin, sowie Auszüge aus *Crataegus oxyacantha*. Die Ergebnisse dieser Versuche versprachen ähnliche Trennleistungen der Gelchromatographie gegenüber dem Gerbstoff des Rotweins.

1.) Entwicklung der Trennmethode.

Bereits beim Grundversuch zur Aufgliederung des Polyamid-Adsorbats (siehe II b 3.) war die wäßrige Lösung der mit Natronlauge desorbierten Fraktion Nr. 16 nach dem Neutralisieren auf eine kleine Sephadexsäule gegeben worden. Die Säule von 1 cm Durchmesser enthielt bis zur Höhe von etwa 20 cm in Wasser vorgequollenes Sephadex G 25, dessen Fraktionierungsbereich zwischen den Molekulargewichten 100 und 5000 liegt. Elutionsmittel war Wasser. Es wurde eine grobe Auftrennung in 2 Fraktionen beobachtet, deren erste dunkelbraun gefärbt war und mit Eisen-III-chlorid/Kaliumferricyanid nur zu einer gelbgrünen Verfärbung führte. Die zweite Fraktion, welche die Säule wesentlich später verließ, war gelbbraun und lieferte mit FeCl_3 /Ferricyanid sofort Berliner Blau. Wurde eine größere Menge Substanz aufgegeben, schien sich der Gerbstoff in 3 Zonen aufzugliedern.

Spätere Versuche mit dem Gerbstoff des 2-l-Versuchs führten - entsprechend der Löslichkeit des Gerbstoffs - zur Gelchromatographie mit alkalischem Lösungs- und Elutionsmittel.

Zunächst bestätigte sich die Beobachtung, daß sich im neutralen pH-Bereich das Gerbstoffgemisch an einer Sephadexsäule in wahrscheinlich mindestens 3 gefärbte Zonen aufgliedern lasse. Für eine präparative Gewinnung der Hauptfraktion kam dieses Verfahren indessen nicht in Frage, da sich mit Wasser als Lösungsmittel keine hinreichend konzentrierten Lösungen herstellen lassen. Außerdem wurde beobachtet, daß die Trennschärfe im neutralen

pH-Bereich durch eine Schwanzbildung besonders der später ablaufenden Fraktion als Folge von Adsorption stark beeinträchtigt wurde. Wurde dagegen der Gerbstoff in Natronlauge gelöst, so konnten sowohl mit 0,2%iger Natronlauge als auch mit Wasser als Elutionsmittel die einzelnen Zonen getrennt werden: eine dunkelbraune, weit vorauslaufende, sowie 2 oder 3 mehr oder weniger eng beieinanderlaufende, gelb- bis orangebraune Zonen mit etwas Schwanzbildung am Ende und untereinander. Zwischen der ersten und der Gruppe der nachfolgenden Zonen war die Trennung vollständig.

Auf einer Säule von 2,2 cm Durchmesser, die bis zur Höhe von 56 cm mit in 0,2%iger Natronlauge vorgequollenem Sephadex G 25 gefüllt war, wurden nun die Gerbstoffe der 5-l-Versuche aufgegliedert. Aufgegeben wurden Lösungen von jeweils 25 und 50 mg Gerbstoff in 5 bzw. 10 ml 0,2%iger Natronlauge. Die Trennergebnisse waren im Vergleich zu den oben für den Gerbstoff des 2-l-Versuchs geschilderten überraschend: In der Reihenfolge des Abtropfens von der Säule, also abnehmenden Molekulargewichts, erschienen:

- Zone 1: dunkelbraun, mit scharfer unterer, weniger scharfer oberer Begrenzung, unmittelbar gefolgt von
- Zone 2: gelbgrün bis oliv, ohne deutliche Begrenzung,
- Zone 3: schmutzigrosa, sehr schwach,
- Zone 4: blau, sehr deutlich begrenzt,
- Zone 5: rosa, schwach,
- Zone 6: gelblich, schwach.

Die Zonen 3 bis 6 schienen beim Gerbstoff des 2-l-Versuchs zu fehlen, mindestens fehlte die auffällige Blauzone, wie ein entsprechender Versuch nochmals zeigte. Das Verhalten dieser Fraktion ließ auf eine sehr hohe Sauerstoffempfindlichkeit schließen: Auch bei der Chromatographie der beiden 5-l-Gerbstoffe trat sie bei jedem Versuch in wechselnder Intensität auf und schien manchmal ganz zu fehlen; beim Abtropfen von der Säule verfärbte sich die blaue Lösung fast augenblicklich nach gelb; bei der Chromatographie der so veränderten Substanz wurden 2 braungelbe Zonen beobachtet. Beim Lösen des trockenen Gerbstoffs in Natronlauge setzte offenbar die Oxydation zu gelben oder braunen Pro-

dukten ein, und die Zeit, die zum Lösen benötigt wurde, kam in der unterschiedlichen Menge der verbliebenen, im alkalischen Bereich blauen, Grundsubstanz zum Ausdruck.

Der Vorgang läßt sich sicherlich mit dem vergleichen, der beim Auflösen von Pyrogallol in Natronlauge stets beobachtet wird. Die dort beinahe als Regel hingegenommene Braunfärbung kann aber durch Sauerstoffausschluß verhindert werden, und es erschien unerlässlich, auch die Aufarbeitung der Gerbstoffe, soweit sie im alkalischen Medium vonstatten ging, entsprechend vorzunehmen.

Als ähnlich leicht oxydierbar erwiesen sich im alkalischen Medium die in neutraler oder saurer Lösung roten Bestandteile der alkoholischen Fraktionen der Desorption vom Polyamid, insbesondere eine beim Chromatographieren an Sephadex auftretende scharf begrenzte blaugüne Zone. Ist, auch beim Auflösen des Farbstoffs in Natronlauge, die Verfärbung von blaugrün nach braun eingetreten, so läßt sich durch nachfolgendes Ansäuern die rote Farbe nicht wieder herstellen.

2.) Trennergebnisse bei Sauerstoffausschluß.

Die zum Ausschluß des Sauerstoffs benutzte Apparatur gibt Abb. 14 schematisch wieder. Vom Flüssigkeitsspiegel in den Säulen A und D bis zur Abtropfkapillare der Austauschersäule B bzw. des Ablaufs E ist die Apparatur frei von Gasblasen, also weitgehend frei von Sauerstoff. Die Vorlage C wird mit Stickstoff durchspült. Fraktionen, die die Sephadexsäule verlassen, werden über die Hähne 1 und 3 und den Austauscher B in die Vorlage C geleitet. Ist eine Fraktion vollständig aus A ausgetreten, dann wird der Hahn 1 geschlossen und der Austauscher mit Wasser aus D über den Hahn 2 ausgewaschen. Nach dem Auswechseln der Vorlage kann dann die nächste Fraktion in gleicher Weise gewonnen werden. Eluate von A, die verworfen werden oder alkalisch bleiben sollen, werden bei geschlossenem Hahn 3 über E abgelassen.

Andererseits kann E auch als Zulauf für das aus der Polyamidsäule austretende alkalische Gerbstoffeluat dienen. Auf diese Weise kann der Austausch des Na^+ gegen H^+ der Desorption mit

Natronlauge ohne Luftzutritt folgen. Wenn der gewonnene Gerbstoff die Apparatur verläßt, reagiert er bereits wieder schwach sauer. Der Austauscher kann ohne Luftzutritt mit Säure aus D regeneriert werden.

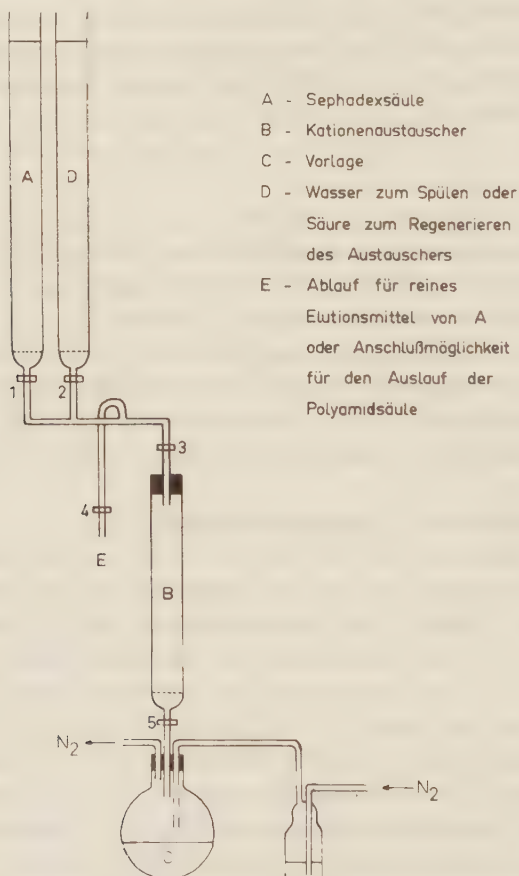


Abbildung 14: Apparatur zur Aufarbeitung alkalischer Gerbstofflösungen unter Luftausschluß

Entsprechende Vorsichtsmaßnahmen sind beim Auflösen des Gerbstoffs und beim Auftragen der Lösung auf die Sephadexsäule zu ergreifen: Man wägt die gewünschte Menge Gerbstoff (25 - 100 mg) in ein kleines Schliffkölbchen ein, füllt dieses mit Stickstoff

und gibt dann rasch 1%ige Natronlauge (2 - 10 ml) zu, spült nochmals mit Stickstoff nach und schwenkt nun bei geschlossenem Stopfen das Kölbchen um, bis aller Gerbstoff gelöst ist. Wenn auf der Säule die Flüssigkeit eben eingesickert ist, pipettiert man rasch eine aliquote Menge (1 - 5 ml) der Gerbstofflösung auf die Oberfläche des Gels. Die Probe sickert ziemlich schnell ein und kann nun mit 0,2%iger Natronlauge entwickelt werden. Der Einfluß von Sauerstoff während dieser Manipulationen ist verhältnismäßig gering, wenn man außerdem den über der Gelschicht stehenden Leerraum der Säule vor dem Auftragen der Probe mit Stickstoff füllt.

Auf diese Weise wurden die Gerbstoffe der 5-l-Versuche noch mehrmals chromatographiert. Dabei gelang es, die empfindliche Blauzone jedesmal in gleicher Intensität zu beobachten. Nach dem Ionenaustausch waren alle Fraktionen mehr oder weniger rot- bis gelbbraun. Sie wurden im Vakuum bei 35° C getrocknet. Dabei entfielen auf die dunkelbraune Hauptfraktion 65 - 75% des Gesamtgewichts der Fraktionen, auf die gelbgrüne Fraktion 17 - 20%. Der Rest verteilte sich in etwa gleichen Anteilen auf die Blau-, die Gelb- und die beiden Rosa-Fraktionen.

Zur schonenden Gewinnung eines Gerbstoffgemischs (Natronlaugefraktion der Desorption vom Polyamid) wurden 2 l Wein im Rotavapor bei 35° C auf etwa 1,3 l eingeengt und auf die Polyamidsäule (5 cm Durchmesser, 30 cm Höhe) gegeben. Nachgewaschen wurde mit 2,25 l Wasser, dann 2 l Aethanol und 7 l Methanol. Dann wurde die Ablaufkapillare der Säule unter Ausschluß von Luftblasen mit dem Ablauf E (Abb. 14) verbunden, der Gerbstoff mit 2 l 0,2%iger Natronlauge abgelöst und die erhaltene Lösung unmittelbar kontinuierlich vom Na^+ befreit. Ein Teil des Gerbstoffs fiel wieder auf dem Austauscher aus; er wurde nach der Beendigung der Desorption herausgespült und mit der Gerbstofflösung vereinigt.

Im Rotavapor wurde bei 35° C das Wasser entfernt, der Rückstand mit Methanol in ein Kristallisierschälchen übergespült und im Vakuumtrockenschrank bei 35° C getrocknet.

Ausbeuten:

Aethanolfraktion:	0,9653 g = 0,4827 g/l,
Methanolfraktion:	0,4014 g = 0,2007 g/l,
Natronlaugefraktion:	1,1285 g = 0,5643 g/l,
Nachlauffraktion:	0,3047 g = 0,1524 g/l.

50 mg der Natronlaugefraktion wurden in 2 ml 1%iger Natronlauge unter Stickstoff gelöst und 1 ml der Lösung auf der Sephadex-G 25-Säule mit 0,2%iger Natronlauge entwickelt. Die Trennung entsprach derjenigen bei den Gerbstoffen der 5-1-Versuche, nur war die Blauzone noch intensiver. Die Braun- und die Gelbgrün-Fraktion, die ohne scharfe Trennung ineinander übergehen, wurden über den Austauscher geleitet, den sie als rotbraune Lösung verließen. Die Lösung wurde im Rotavapor bei 35° C eingeeengt; der Rückstand war gelbbraun.

Die auffallende Blauzone und die beiden sie umsäumenden Rosazonen wurden - jeweils gesondert - in alkalischer Lösung unter Stickstoff aufgefangen. Die beiden rosafarbenen Lösungen hielten sich innerhalb 1 Std, während die blaue Lösung nach 20 min rosa geworden war; die 3 Fraktionen wurden mit Essigsäure gelb und mit Natronlauge wieder rosa; nach 2 Tagen waren sie irreversibel gelb gefärbt. Die Farbtöne der 3 Fraktionen sind also, ähnlich den Naturfarbstoffen, pH-abhängig; außerdem sind die Substanzen in alkalischer Lösung sehr sauerstoffempfindlich, offenbar am meisten der in diesem Medium blau gefärbte Stoff.

Wird die blaue Fraktion in einer Durchflußküvette unter Luftausschluß aufgefangen, so ist sie beständig. Wenn Zu- und Abfluß der Küvette abgeklemmt werden, läßt sich ohne weiteres das Absorptionsspektrum der Substanz aufnehmen. Im Spektrophotometer 137 UV (Perkin-Elmer) wurden ein Absorptionsmaximum bei 475 nm und ein starkes Absorptionsmaximum bei 630 nm festgestellt. Letzteres verschwindet vollständig (mit der blauen Farbe), wenn nach dem Öffnen der Küvette eine Luftblase mehrere Male durch den Küvetteninhalt bewegt wird (Abb. 15). Säuert man dagegen die blaue Lösung unter Luftabschluß an, so schlägt die Farbe nach rosa um; dieser Vorgang ist reversibel im Gegensatz zu dem Farbumschlag nach gelb beim Luftzutritt.

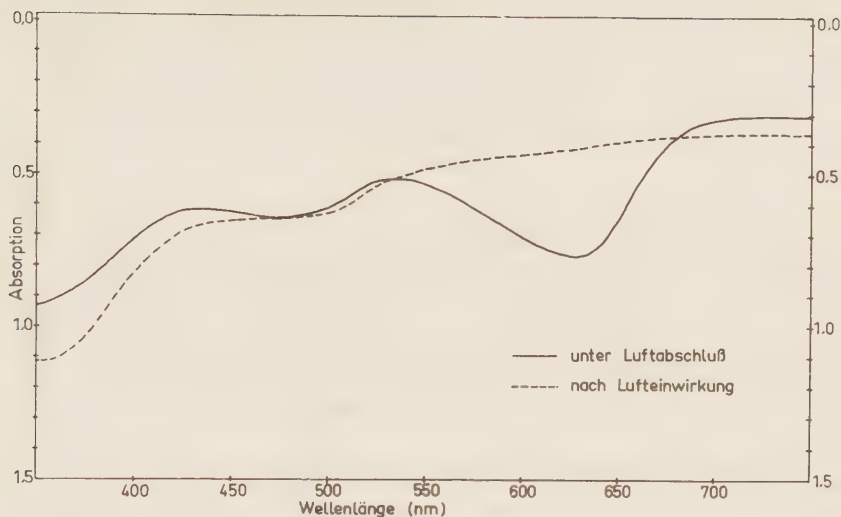


Abbildung 15: Absorptionsspektrum der im alkalischen Medium blauen Gerbstofffraktion

3.) Trennergebnisse beim Wechsel des Trägers.

Es war noch zu überprüfen, ob sich nicht die braunen bis gelbgrünen Hauptfraktionen noch besser trennen lassen. Ihre schnelle Wanderung durch die Säule ließ vermuten, daß der braune Anteil des Gerbstoffgemischs im Sephadex G 25 mit der Front wandert, also ein Molekulargewicht von über 5000 besitzt. Dies widerspräche der in der Einleitung referierten Auffassung anderer Autoren, insbesondere der von Ribéreau-Gayon (2), der den mittleren Polymeren etwa vom Dimeren bis Dekameren (MG = etwa 3000) die eigentlichen "Gerbstoff"-Eigenschaften zuspricht. Andererseits nennen Porter und Schwartz (20) eine pektinasehemmende Substanz vom Molekulargewicht 250000, die sie aus Rebenblättern isoliert haben, ebenfalls noch "Gerbstoff". Erst eine Säurebehandlung führe sie in Phlobaphene über.

Zur Klärung dieser Frage mußte das Ausschlußvolumen V_0 der verwendeten Säule bestimmt werden. Es ist dies die Menge Flüssig-

keit, die aus der Säule abfließt, ehe ein Stoff, der nicht in die Gelporen eindringen kann, im Eluat erscheint. Zur Bestimmung von V_0 hat die Pharmacia (Uppsala, Schweden) ein blau gefärbtes Dextran mit einem Molekulargewicht von 2 Millionen unter dem Namen "Blue Dextran 2000" in den Handel gebracht. Diese Substanz wird von allen gebräuchlichen Dextrangelen ausgeschlossen.

Eine Säule von 2,2 cm Durchmesser, die bis zur Höhe von 48 cm mit Sephadex G 25 gefüllt war, dessen Fraktionierungsbereich zwischen den Molekulargewichten 100 und 5000 liegt, trennt aus einer Mischlösung von Gerbstoff und Blue Dextran 2000 den blauen Indikator nicht von der braunen Gerbstoffhauptidefraktion. Der erste die Säule verlassende gefärbte Tropfen war braunviolett.

Eine Säule von 2 cm Durchmesser, die bis zur Höhe von 35 cm mit Sephadex G 50 gefüllt war, dessen Fraktionierungsbereich zwischen den Molekulargewichten 500 und 10000 liegt, trennt aus einer gleichartigen Mischlösung das Blue Dextran 2000 geringfügig, aber deutlich von den ersten Gerbstoffanteilen. Die ersten 4 ml des gefärbten Eluats waren rein blau. Die Braunzonen wurden gegenüber Sephadex G 25 weiter auseinander gezogen, ohne sich jedoch voneinander abzusetzen. Dagegen war die Abtrennung der scharf begrenzten Blauzone von den letzten olivgrünen Anteilen sehr gut. Der Blauzone folgten sehr schwache Gelb- und Rosazonen.

Eine Säule von 2,5 cm Durchmesser, die bis zur Höhe von 20 cm mit Sephadex G 75 gefüllt war, dessen Fraktionierungsbereich zwischen den Molekulargewichten 1000 und 50000 liegt, hielt die Hauptmenge der braunen Fraktion noch weiter hinter der Zone des Blue Dextran 2000 zurück, ohne jedoch irgendwelche Trennvorteile zu bieten.

Die nachfolgende Aufstellung gibt einen Überblick über die K_d -Werte der einzelnen Fraktionen unter den verschiedenen Bedingungen, sowie die zu ihrer Berechnung benutzten Größen. Dabei bedeuten (49) (50):

V_t = Volumen der Säulenpackung,

d = Dichte des gequollenen Gels, Materialkonstante,

W_r = Wasseraufnahmefähigkeit des Trockengels in g/g, Materialkonstante,

V_o = äußeres oder Ausschlußvolumen,

$$V_i = \frac{W_r \cdot d}{W_r + 1} \cdot (V_t - V_o) = \text{inneres Volumen des Gels,}$$

V_e = Elutionsvolumen der entsprechenden Zone,

$$Kd = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \text{Verteilungskoeffizient, konstant für die betreffende Zone, nur abhängig von der Art des Gels, gibt den Bruchteil von } V_i \text{ an, der den betreffenden Molekülen zugänglich ist.}$$

Der Kd -Wert hat für eine Substanz, die auf Dextrangelen in Form einer deutlich abgesetzten Zone chromatographiert werden kann, einen ähnlichen Aussage- oder Charakterisierungswert wie der R_f -Wert bei der Papier- oder Dünnschichtchromatographie. Substanzen mit dem Kd -Wert = 0 laufen mit der "Lösungsmittelfront", weil sie wegen der Größe ihrer Moleküle nicht in die Gelporen, das heißt in V_i , eintreten können. Substanzen mit dem Kd -Wert = 1 bestehen aus so kleinen Molekülen, daß sie bei langsamer Elution in jede Pore des Gels eindringen können; entsprechend länger verweilen sie auf der Säule.

Die genaue Festlegung der Fraktionierungsbereiche der einzelnen Sephadextypen erlaubt daher eine grobe Orientierung über die Molekülgröße, das heißt in etwa auch über das Molekulargewicht hochmolekularer Substanzen - immer vorausgesetzt, daß Adsorptionen ausgeschlossen werden können.

Demnach stellt die braune Gerbstoff-Hauptfraktion ein Gemisch von Substanzen mit Molekulargewichten zwischen 5000 und 10000 dar: Sephadex G 25 mit der Ausschlußgrenze $MG = 5000$ schließt sie aus, Sephadex G 50 mit der Ausschlußgrenze $MG = 10000$ aber nicht.

Sephadex	V _t (ml)	d	W _r (g/g)	V _o (ml)	V _i (ml)	V _e (ml)	Kd	Zone
G 25	182	1,13	2,5	59	100	59-70	0,00-0,11	braun
						95-100	0,36-0,41	blau
G 50	110	1,07	5,0	29	72	33-55	0,06-0,36	braun
						74-77	0,63-0,67	blau
G 75	98	1,05	7,5	29	64	34	0,08	braun, Anfang
						45-60	0,25-0,48	braun, Maxim.
						80-85	0,80-0,88	blau

Übersicht über das Trennvermögen von Sephadex-Dextrangelen
gegenüber dem Gerbstoff des Rotweins

Auf Sephadex G 75, dessen Trennleistung gerade für Molekulargewichte zwischen 1000 und 50000 maximal ist, wird die Braunzone weit auseinander gezogen; auf rötliche Eluate folgt nach dem allmählichen Anstieg der Farbtintensität ein gelbbraunes Konzentrationsmaximum, dann jeweils ohne Zwischenräume die olivgrüne und die blaue Zone. Von den übrigen bei G 25 beobachteten schwachen Zonen erscheint nur eine Rosazone als schmaler Obersaum der blauen.

Dieser Elutionsverlauf erlaubt die bereits vorweggenommene Folgerung, daß die braune Hauptfraktion keine einheitliche Substanz, sondern ein Gemisch verschiedener, im Molekulargewicht jeweils nur wenig differierender Substanzen darstellt. Denn betrachtet man die Vielzahl der möglichen Monomeren, sowie die außerordentlich große Zahl von Kombinationsmöglichkeiten beim Aufbau der Kondensate, so kann man sagen: Wenn sich in einem Gemisch vieler Substanzen die einzelnen Komponenten nur durch die Zahl und Anordnung der Hydroxylgruppen, höchstens aber durch eine Galloylgruppe mehr oder weniger unterscheiden, dann reichen im Molekulargewichtsbereich zwischen 1000 und 50000 die Trenneigenschaften eines Molekularsiebes nicht mehr aus; vielmehr dürften darüberhinaus durch die Überlappungen so vieler Einzelfraktionen auch die Grenzen zwischen den einzelnen Kondensationspolymeren selbst verwischt werden.

Die Tatsache, daß die blaue Zone bei der Verwendung von Sephadex G 75 noch einen K_d -Wert unter 1 hat, deutet darauf hin, daß ihr Molekulargewicht über 1000 beträgt (untere Fraktionierungsgrenze von Sephadex G 75). Danach stellt die alkalischen Medium blaue Verbindung kein monomeres Anthocyanidin, sondern ein Kondensationsprodukt aus mehr als 3 Grundmolekeln dar.

Außerdem ist auch die Auftrennung der scharf abgesetzten später folgenden Zonen auf G 25 am besten, so daß die getrennte Gewinnung auch dieser Fraktionen nebenher möglich wird.

Die Isolierung der Zonen 1 = braun, 2 = olivgrün, 3 = blau, 4 = gelb wurde auf der schon mehrfach benutzten Säule von 2,2 cm Durchmesser und 48 cm Höhe mit einer Ausgangsmenge von 100 mg

Gerbstoffgemisch, gelöst in 3 ml 1%iger Natronlauge, unter Stickstoff vorgenommen. Die rosa gefärbten schwachen Zwischenzonen vor und nach der blauen Zone wurden verworfen; die braune und die olivgrüne Zone wurden so getrennt, daß die letztere keine braunen Anteile mehr enthielt.

Nach dem Kationenaustausch fielen die Fraktionen mit folgenden Farbtönen an: 1 = rotbraun, 2 = braun, 3 = rosa, 4 = blaßgelb. Sie wurden jeweils sofort im Rotavapor bei 35° C zur Trockne eingeeengt und im evakuierten Exsikkator über Blaugel aufbewahrt.

c) Eigenschaften der Gerbstoff - Hauptfraktion.

Die Fraktionen der Sephadextrennung sind in Wasser schwer, in Methanol sowie im Methanol-Wasser-Gemisch (1+1) gut löslich.

Zu den folgenden Reaktionen wurde je 1 ml der rotbraunen 0,1%igen Lösung der Hauptfraktion verwendet. Sie wurde in der oben beschriebenen Weise unter Stickstoff durch Zusatz von Natronlauge und Neutralisieren mit Essigsäure hergestellt.

Reaktionen:

+ 1 ml 10%iger Natronlauge	Braunfärbung, beim Erhitzen keine Änderung
+ 1 ml 12,5%iger Salzsäure	gelbbraune Verfärbung, beim Erhitzen Trübung
+ 3 Tropfen Bleiessig	brauner Niederschlag
+ 3 Tropfen 10%iger Eisenchloridlösung	grünbrauner Niederschlag
+ 1 ml FeCl_3 /Ferricyanid	blauer Niederschlag
+ 1 ml 1%iger alkoholischer Vanillinlösung + 2 ml rauchender Salzsäure	keine Rotfärbung
+ 1 Spatelspitze Hautpulver	beim Schütteln Adsorption
+ 3 Tropfen 0,5%iger Gelatinelösung	bräunliche Ausflockungen, sehr stark in 1%iger Gerbstofflösung

Die Hauptfraktion des Gerbstoffgemischs erwies sich als ein echter Gerbstoff, der in Übereinstimmung mit den von B u r k -

h a r d t (9) gemachten Angaben nicht mehr mit Vanillin-Salzsäure reagiert. Er liefert Fällungen mit Schwermetallsalzen, reduziert stark und gerbt festes und gelöstes Eiweiß.

Entsprechende Lösungen der im alkalischen Medium olivgrünen, blauen und gelben Fraktionen reagieren mit Gelatine, Hautpulver, Vanillin-Salzsäure und FeCl_3 /Ferricyanid wie die Hauptfraktion.

Die chromatographische Prüfung der isolierten Fraktionen ließ keine eindeutigen Schlüsse auf ihre Reinheit zu: Wie das Gerbstoffgemisch selbst, so liefern auch seine Fraktionen sämtlich Bärte von $R_f = 0$ bis $R_f = 0,7$ (Fließmittel 27) bzw. $R_f = 0,85$ (Fließmittel 17). Bei der Blau- und der Gelbfraktion scheinen sich an diesen Punkten geringe Substanzmengen anzureichern (schwache Fleckenbildung). Wie mit Fl. 27 nachgewiesen werden kann, liegen diese Flecken höher als der des Catechins ($R_f = 0,4$). Welcher Art diese Substanzen auch sein mögen, ihre Menge ist stets im Verhältnis zu der am Startpunkt verbleibenden äußerst gering, so daß sie erst nach dem Besprühen mit FeCl_3 /Ferricyanid sichtbar werden.

IV. Diskussion eines anderen Weges der Gerbstoffgewinnung.

Kurz vor dem Abschluß der vorliegenden Arbeiten veröffentlichte S o m e r s (53) ein Verfahren, Rotweingerbstoff in saurem alkoholisch-wäßrigem Medium an Sephadexgelen zu trennen. Die Vorreinigung wird nicht durch Adsorption-Desorption an Polyamid, sondern durch oft wiederholte Bleifällung vorgenommen. Es erschien ebenso notwendig wie interessant, die Trennleistungen von Sephadex am Gerbstoffgemisch in saurem verdünntem Alkohol mit denjenigen in verdünnter Lauge zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurde eine Säule von 1,5 cm Durchmesser bis zur Höhe von 37,5 cm mit Sephadex G 25 gefüllt, das über Nacht in dem Elutionsmittel (60 Teile Aethanol, das 0,1% Salzsäure enthält, + 40 Teile Wasser) vorgequollen war. In 2 ml des Elutionsmittels wurden 10 mg Gerbstoffgemisch gelöst und auf die Säule aufgetragen.

Es wurde eine Trennung in 2 Fraktionen ohne deutliche Abgrenzung erhalten. Nach der Elution von etwa 27 ml begann ein rötlich-braunes, nach etwa 35 ml ein karminrotes Eluat abzutropfen. Nach der Elution von etwa 70 ml war die Säule wieder frei von Gerbstoffen.

Eine Reihe von Versuchen, die Trennschärfe der Säule durch Variation der Durchflußgeschwindigkeit und der aufgetragenen Gerbstoffmenge oder durch Umschichtung der Gelpackung zu verbessern, führte zu dem Ergebnis, daß die Chromatographie mit saurem verdünntem Alkohol der mit verdünnter Lauge unterlegen ist. In keinem Falle ließ sich eine deutlichere Zonentrennung erreichen.

Einerseits scheinen sich Adsorptionen auch in 60%igem Aethanol nicht ganz vermeiden zu lassen: S o m e r s benötigt zur vollständigen Elution Lösungsmittelmengen, die K_d -Werten von über 1 entsprechen, während bei der alkalischen Chromatographie die letzten Gerbstoffanteile die Säule bereits vor $V_e = V_0 + V_i$ verlassen, was K_d -Werten von unter 1 entspricht. Diese Daten wurden durch Elutionskurven erhalten, die der elektronische Kompensationsschreiber Linecomp (Hartmann & Braun, Frankfurt a.M.) aus dem Absorptionsspektrum des Eluats aufzeichnete, aufgenommen mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II in einer Quarz-Durchflußküvette von 1 cm Schichtdicke, bei 285 nm. Die aufgetragene Gerbstoffmenge betrug 0,5 ml einer Lösung von 15 mg Gerbstoffgemisch in 10 ml 0,2%iger Natronlauge.

Andererseits ist die Vorreinigung mit Hilfe der Polyamidsäule eine schonendere als die oft wiederholte Bleifällung. Denn die Methode ermöglicht in einem Arbeitsgang zunächst die Abtrennung der Extraktstoffe des Weines und dann der Farbstoffe und der Hauptmenge der monomeren Gerbstoffvorstufen. Während dieser Arbeitsgänge bleibt der adsorbierte Gerbstoff stets unter Luftabschluß; unter Verwendung der oben beschriebenen Apparatur kann er nach der Desorption mit Natronlauge ebenfalls ohne Zutritt von Sauerstoff unverzüglich vom Na^+ befreit werden. Bei der Überführung des Auffanggefäßes zum Rotavapor kann zwar der Gerbstoff vor der Trocknung mit Luft in Berührung kommen. Zu diesem Zeitpunkt liegt er aber bereits wieder in schwach saurer Lösung vor.

Die S o m e r s sche Hypothese, daß Anthocyanidine am Aufbau der Gerbstoffstruktur beteiligt sind, scheint sich durch die Tatsache zu bestätigen, daß die im alkalischen Bereich blaue Fraktion ein Molekulargewicht über 1000, das heißt bei Sephadex G 75 noch einen Kd-Wert unter 1 hat. Die an der S o m e r s schen Säule bei etwa 45 ml Elutionsvolumen in maximaler Konzentration abtropfende karminrote Zone wird auf Laugezusatz blau; das Absorptionsmaximum dieser Blaufärbung liegt wie das der auf alkalischem Wege gewonnenen Blauzone bei 630 nm. Es dürfte sich um die gleiche Substanz handeln.

C. Zusammenfassung.

Die Unklarheit im Schrifttum über den Begriff "Gerbstoff" und die Unsicherheit der Analytik der Gerbstoffe veranlaßten dazu, die Isolierung einer repräsentativen Gerbstofffraktion aus Rotwein zu versuchen. Der so gewonnene Gerbstoff sollte mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden charakterisiert werden.

Nach einer kurzen Übersicht über die Chemie der weitgehend bekannten natürlichen Gerbstoffbausteine, über ihre Verknüpfung zu Gerbstoffen und über einige Methoden, den Gerbstoffgehalt in Pflanzenextrakten oder Lebensmitteln zu bestimmen, wird der Begriff "Gerbstoff" festgelegt. In Anlehnung an modernere Vorstellungen wird darunter ein Stoff verstanden, der in der Lage ist, Hauteiweiß in nicht fäulnisfähiges Leder zu verwandeln oder aus Eiweißlösungen Niederschläge auszufällen. Die in Lebensmitteln auftretenden kondensierten Gerbstoffe haben diese Eigenschaften.

Die Ergebnisse der experimentellen Arbeit lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1.) Ausschüttellextrakte aus dem Preßmost und Soxhlet-extrakte aus den Trestern eines deutschen Rotweins stellen sehr komplexe Gemische dar, wie die Dünnschichtchromatographie dieser Substanzen an Polyamid und Kieselgel zeigt. Ihre Komponenten unterscheiden sich dagegen im UV-Absorptionsspektrum und im Adsorptionsverhalten gegenüber Polyamidpulver nicht wesentlich.

2.) Eine chromatographische Analysenmethode zur optimalen Auftrennung von Gerbstoffgemischen wird entwickelt. Die mit Essigester aus dem Rotwein ausgeschüttelten Gerbstoffe nimmt man nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Methanol auf. Diese Lösung wird streifenförmig auf die Startlinie einer Kieselgel-H-Platte (E. Merck, Darmstadt) von 0,2 mm Schichtdicke aufgetragen und nacheinander 3 mal mit Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5+4+1) bis zur Steighöhe von 18 cm, danach 2 mal mit Äthylmethylketon-Äthanol-Ameisensäure (7+2+1) bis zur Steighöhe von 11,5 cm entwickelt. Dabei ist das zweite Fließmittel

wegen seiner höheren Polarität in der Lage, hauptsächlich noch Farbstoffe aus der Startzone zu eluieren.

3.) Zur raschen Chromatographie ohne wiederholtes Entwickeln erweist sich das Fließmittel Essigester-Chloroform-Ameisensäure (5+4+1) für die weniger polaren und das Fließmittel Aethylmethyleton-Essigester-Ameisensäure (7+2+1) für die stärker polaren Substanzen als am günstigsten. Eine weitere Steigerung der Polarität der Fließmittel führt nicht mehr zur Elution weiterer definierter Zonen aus dem Startpunkt. Als Sprühreagens zur Detektion von Spuren wurde eine Mischung aus gleichen Teilen einer 1%igen Eisen-III-chloridlösung und einer 1%igen Kaliumferricyanidlösung verwendet.

4.) Die präparative Gewinnung des Gerbstoffs aus dem Wein erfolgt durch schrittweise Desorption der an Polyamid adsorbierbaren Substanzen. Der vom Alkohol befreite Wein wird über eine mit dem in Wasser vorgequollenen Polyamidpulver Divergan (BASF, Ludwigshafen) gefüllte Säule gegeben. Dabei werden Gerbstoffe, Gerbstoffvorstufen und Farbstoffe adsorbiert. Durch Elution mit Aethanol, dann mit Methanol werden die beiden letztgenannten Adsorbatfraktionen von der Säule entfernt. Die verbliebenen braun gefärbten Gerbstoffe werden nun mit 0,2%iger Natronlauge desorbiert. Die alkalische Lösung wird unmittelbar unter Luftausschluß auf den Kationenaustauscher Duolite C 25 (Benckiser) geleitet und dort vom Na^+ befreit, das Wasser im Rotavapor R (Büchi) bei 35°C abdestilliert und der dunkelbraune, lackartig glänzende Rückstand zu Pulver zerrieben.

5.) Dieses Gerbstoffgemisch, das meist noch nicht völlig frei von monomeren Gerbstoffvorstufen ist, wie durch Chromatographie mit den genannten Fließmitteln geprüft werden kann, läßt sich an Dextrangelen der Art Sephadex G 25, G 50 und G 75 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit 0,2%iger Natronlauge als Elutionsmittel weiter aufgliedern. Achtet man schon beim Auflösen des Gerbstoffs in Natronlauge (etwa 50 mg in 2 ml 1%iger Natronlauge) darauf, durch Spülen mit Stickstoff Einflüsse von Sauerstoff zu vermeiden, so erhält man an Sephadex G 25 eine Auftrennung in eine braune Hauptfraktion (K_d -Wert = 0 bis 0,11) und eine

blaue Nebenfraktion (K_d -Wert = 0,36 bis 0,41). Die blaue Zone ist von 2 schmalen rosa erscheinenden Zonen eingesäumt und von einer schwach ausgeprägten gelben Zone gefolgt. Zwischen dieser Gruppe von Zonen und der Hauptfraktion liegt eine olivgrüne Zwischenfraktion.

6.) Sämtliche Fraktionen reduzieren stark, fällen Gelatine aus ihrer Lösung und werden von Hautpulver adsorbiert. Keine Fraktion reagiert mit Vanillin-Salzsäure. Mit Hilfe der Ausschlußgrenzen der 3 genannten Sephadex-Typen gelingt eine ungefähre Abschätzung der Molekulargewichte der Fraktionen: Sie dürften für die braune Hauptfraktion zwischen 5000 und 10000 liegen, für die blaue Nebenfraktion zwischen 1000 und 5000; die isolierten Substanzen sind im Sinne der Definition Gerbstoffe.

D. Literaturverzeichnis.

- (1) Hennig, K. Weinberg und Keller 4, 374 (1957)
Burkhardt, R
- (2) Ribéreau-Gayon, P. DLR 62, 1 (1966)
Stonestreet, E.
- (3) Schmidt, O.Th. Angew. Chem. 68, 103 (1956)
Mayer, W.
- (4) Herrmann, K. DLR 59, 309 (1963)
- (5) Freudenberg, K. Liebigs Ann. Chem. 590, 140 (1955)
Weinges, K.
- (6) Mayer, W. Liebigs Ann. Chem. 644, 79 (1961)
Merger, F.
- (7) Freudenberg, K. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 16,
Weinges, K. 1 (1958)
- (8) Herrmann, K. ZUL 109, 487 (1959)
- (9) Burkhardt, R. Weinberg und Keller 10, 274 (1963)
- (10) Bate-Smith, E.C. Chem. and Ind. 77, 377 (1953)
Swain, T.
- (11) Bate-Smith, E.C. Biochem. J. 58, 122 (1954)
- (12) Roux, D.G. Biochem. J. 69, 530 (1958)
Evelyn, S.R.
- (13) Roux, D.G. Biochem. J. 70, 344 (1958)
Evelyn, S.R.
- (14) Herrmann, K. ZUL 112, 105 (1960)
- (15) Pigman, W. Techn. Assoc. Pulp and Paper Ind. 36,
Anderson, E. 4 (1953); ref. C.A. 47, 10844 (1953)
Fischer, R.
Buchanan, M.A.
Browning, B.L.
- (15a) Haslam, E. "Chemistry of Vegetable Tannins",
Akademic Press, London and New York
1966
- (16) Dekker, J. "Die Gerbstoffe", Gebr. Borntraeger,
Berlin 1913
- (17) Colagrande, O. Riv. Viticolt. 13, 401 (1960); ref.
ZUL 118, 196 (1962)

- (18) Diemair, W. Z. anal. Chem. 133, 353 (1951)
Janecke, H.
Krieger, G.
- (19) Hennig, K. Weinberg und Keller 5, 542 und 593
Burkhardt, R. (1958)
- (20) Porter, W.L. J. Food Sci. 27, 416 (1962)
Schwartz, J.H.
- (21) Owades, J.L. J. Agric. Food Chem. 6, 44 (1958)
Rubin, G.
Brenner, M.W.
- (22) Hathway, D.E. Biochem. J. 67, 239 (1957)
Seakins, J.W.T.
- (23) Margheri, G. Riv. Viticolt. 13, 401 (1960); ref.
ZUL 116, 200 (1962)
- (24) Sengewald, H. Diss. Frankfurt a.M. 1961
- (25) Carelli, V. Nature (Lond.) 176, 70 (1955)
Liquori, A.M.
Mele, A.
- (26) Grassmann, W. Makromol. Chem. 21, 37 (1956)
Hörmann, H.
Hartl, A.
- (27) Hörhammer, L. Naturwiss. 44, 513 (1957)
Wagner, H.
Leeb, W.
- (28) Diemair, W. ZUL 120, 173 (1963)
Postel, W.
Sengewald, H.
- (29) Grassmann, W. Chem. Ber. 90, 1125 (1957)
Endres, H.
Pauckner, W.
Mathes, H.
- (30) Endres, H. Z. anal. Chem. 181, 331 (1961)
- (31) Endres, H. Angew. Chem. 75, 288 (1963)
Hörmann, H.
- (32) Grassmann, W. Leder 10, 149 (1959)
Endres, H.
Oppelt, M.
El Sissi, H.
- (33) Wucherpfennig, K. Weinberg und Keller 2, 37 (1962)
Bretthauer, G.

- (34) Stahl, E. "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, Seite 390
- (35) Randerath, K. "Dünnschichtchromatographie", Chemie GmbH Weinheim 1962, Seite 180
- (36) Martin, W.N. Analyt. Chemistry 33, 840 (1961); ref. Husband, R.M. Z. anal. Chem. 208, 293 (1965)
- (37) Davidek, J. ZUL 115, 113 (1961)
Pokorný, J.
- (38) Egger, K. Z. anal. Chem. 182, 161 (1961)
- (39) Birkhofer, L. Z. Naturforsch. 17 b, 352 (1962)
Kaiser, C.
Meyer-Stoll, H.-A.
Suppan, F.
- (40) Wang, K.T. J. Chin. chem. Soc., Ser. 2, 10, 146
Lin, Y.T. (1963); ref. Z. anal. Chem. 208, 293
(1965)
- (41) Egger, K. Z. anal. Chem. 211, 187 (1965)
Kleinig, H.
- (42) Stahl, E. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 325,
Schorn, P.J. 263 (1961)
- (43) Halpaap, H. Chemie Ing. Techn. 35, 488 (1963)
- (44) Hörhammer, L. Pharm. Ztg. 104, 783 (1959)
Wagner, H.
- (45) Hörmann, H. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315,
von Portatius, H. 141, (1959)
- (46) Wucherpfennig, K. ZUL 124, 22 (1964)
Franke, J.
- (47) Porath, J. Nature (Lond.) 183, 1657 (1959)
Flodin, P.
- (48) Determann, H. Experientia 18, 430 (1962)
Wieland, Th.
Determann, H.
- (49) Determann, H. Angew. Chem. 76, 635 (1964)
- (50) Determann, H. in: Rauen, H.M. - "Biochemisches Taschen-
Gelotte, B. buch", 2. Aufl., Springer Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York
1964, Band I, Seite 905 ff.

- (51) Woof, F.B. Nature (Lond.) 195, 184 (1962)
- (52) Boser, H. Ärztl. Forsch. 16, 199 (1962)
von Eickstedt, K.W.
Giertz, H.
- (53) Somers, T.C. Nature (Lond.) 209, 368 (1966)

Lebenslauf

Am 22. November 1937 wurde ich, Karl Armin P o l s t e r , als erstes Kind des Prokuristen Karl Polster und seiner Ehefrau Irmgard geb. Schädlich, in Chemnitz geboren. Seit dem 28. April 1965 bin ich verheiratet.

In Oberfrohna (Sachsen) besuchte ich von Michaelis 1943 bis Weihnachten 1949 die Volksschule. Nach der Übersiedlung unserer Familie in die Bundesrepublik wurde ich im Januar 1950 in den altsprachlichen Zweig des Progymnasiums zu Lobberich (Niederrhein) aufgenommen. Seit Januar 1953 besuchte ich dann den altsprachlichen Zweig des Ratsgymnasiums zu Osnabrück, wo ich am 27. Februar 1958 die Reifeprüfung bestand.

Von Anfang April 1958 bis Ende März 1960 absolvierte ich meine Lehrzeit als Apothekerpraktikant in der Einhorn-Apotheke zu Osnabrück. Am 12. März 1960 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung. Im Sommersemester 1960 begann ich an der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br. das Studium der Pharmazie und bestand am 1. April 1963 die pharmazeutische Prüfung.

Im Mai 1963 trat ich meine Tätigkeit als Praktikant im Lebensmitteluntersuchungsamt zu Frankfurt a.M. an und immatrikulierte mich zugleich an der Johann Wolfgang Goethe-Universität für das Fach Lebensmittelchemie. Nach der Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker, die ich am 7. Juli 1964 bestand, übertrag mir Herr Professor Dr. Dr. W. D i e m a i r eine Dissertationsarbeit zur präparativen Gewinnung von Rotweingerbstoffen. Mit der praktischen Durchführung dieser Arbeit begann ich im Oktober 1964 und schloß sie im August 1966 ab.

